

精巢胚細胞腫瘍の各組織型と病型におけるDNMT3Lタンパクの発現についての研究

著者	松岡 妙子
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7868号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00143989

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

精巢胚細胞腫瘍の各組織型と病型における
DNMT3L タンパクの発現についての研究

2 0 1 5

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

松 岡 妙 子

目次

1 研究の背景	3
1-1 精巣胚細胞腫瘍の臨床	3
1-2 発生と分化	4
1-3 病理学的診断	5
1-4 DNA メチル化	5
2 研究の目的	8
3 研究1・精巣腫瘍における DNMT3L タンパクの免疫組織学的検討	9
3-1 対象と方法	9
3-2 結果	12
3-3 考察	16
4 研究2・胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L タンパクの発現とその機能について の検討	21
4-1 対象と方法	21
4-2 結果	25
4-3 考察	28
5 本研究の限界と今後の展望と予定	31
6 総括	33
7 謝辞	34
8 引用文献	35
9 図表	40
図 1 精巣腫瘍の組織型	40
図 2 精巣腫瘍における DNMT3L の mRNA 発現率	41
図 3 組織マイクロアレイ（ヘマトキシリンエオジン染色）	42
図 4 組織型による DNMT3L 陽性率の比較	43
図 5 胎児性癌の免疫染色例	44
図 6 病期 I 単一型セミノーマの免疫染色例	45
図 7 血清 AFP 上昇を伴うセミノーマの原発精巣の組織像	46
図 8 血清 AFP 上昇を伴うセミノーマの原発精巣の免疫染色	47
図 9 非セミノーマのセミノーマ成分の免疫染色例	48

図 10 思春期前発症の単一型卵黄嚢腫瘍の免疫染色例	49
図 11 絨毛癌（混合型）の免疫染色例	50
図 12 奇形腫の免疫染色例	51
図 13 病期による DNMT3L 陽性率の比較	52
図 14 セミノーマの 5mc、5hmc の免疫染色	53
図 15 非セミノーマの 5mc、5hmc の免疫染色	54
図 16 胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L の発現	55
図 17 RNA 干渉法による NEC8 細胞における DNMT3L の発現抑制.....	56
図 18 NEC8 細胞における DNMT3L 発現抑制時の分化マーカーの mRNA 発現解析.....	57
図 19 NEC8 細胞における DNMT3L 発現抑制時の癌抑制遺伝子の mRNA 発現解析.....	58
図 20 DNMT3L 発現抑制が悪性化に及ぼす影響についての検討.....	59
表 1 TNM 分類（UICC 第 7 版）	60
表 2 TNM 病期分類（UICC 第 7 版）	61
表 3 日本泌尿器科学会病期分類	62
表 4 国際胚細胞腫瘍予後分類 (IGCCC)	63
表 5 組織型による免疫染色の染色パターン	64
表 6 解析対象の組織型と検体数	65
表 7 組織型別の病期の詳細	66
表 8 5mc、5hmc の免疫組織化学的解析.....	67
表 9 検出に用いたプライマー	68

1 研究の背景

1-1 精巣胚細胞腫瘍の臨床

精巣胚細胞腫瘍(以下、精巣腫瘍)は日本人男性 10 万人あたり 1.1–2.7 人¹と頻度は低いが、青壮年期の男性においては最も頻度が高い悪性腫瘍である。また、転移を有する場合でも化学療法、外科療法、放射線治療を組み合わせた集学的治療により高い治癒率が得られることが知られている。具体的には病期 I であれば再発してもほぼ 100%治癒し、転移があっても 70–80%は治癒が得られる²。しかし、一部の症例が再発、転移を繰り返すなど、治療抵抗性を示すのが臨床上の大きな問題である。

病理学的に精巣腫瘍は、セミノーマ、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌、奇形腫などの主な組織型に分類できる。また、一つの組織型のみからなる単一型である場合と複数の組織型から構成される混合型である場合に大別される。臨床的には単一組織型のセミノーマと、それ以外の組織型のいずれかの成分を含む非セミノーマに大きく分類される(図 1)³。セミノーマと非セミノーマの鑑別は、両者に対する治療方法や予後が異なるため非常に重要である。

以上の病理学的分類に加え LDH、HCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン)、AFP (α -fetoprotein) の 3 種の腫瘍マーカーが診断及び治療の両面から重要である。LDH は疾患特異的マーカーではないが、陽性率が高く、病勢を反映することが多い。HCG は絨毛癌で高値となるが、他の組織型でも上昇することがあり、セミノーマの一部でも異常値を呈することがある。一方で AFP は卵黄嚢腫瘍の成分を有する場合と胎児性癌で上昇し、セミノーマでは産生されないとされる。従って原発精巣が単一型セミノーマであっても血清 AFP が高値を示す場合は、臨床的には非セミノ

マとして治療を行うことが原則とされている。

精巣腫瘍の臨床病期分類には TNM 分類(UICC 第 7 版)(表 1、2)⁴や日本泌尿器科学会病期分類(表 3)⁵、リスク層別化のための国際胚細胞腫瘍予後分類(International Germ Cell Cancer Consensus Classification[IGCCC])(表 4)⁶がよく知られている。TNM 分類は他臓器の悪性腫瘍とは異なり、T 分類は原発精巣摘除後の病理診断によって決定する。また、S 因子として血清腫瘍マーカーが加えられるが、その数値も精巣摘除術後の最低値に基づいて行われる。IGCCC 分類は腫瘍マーカー値を重視した分類法であり、予後をよく反映することから、国際的予後分類として評価が確立している。

1-2 発生と分化

青壮年期に発生する精巣腫瘍は始原生殖細胞(Primordial germ cell:PGC)より発生し、精細管内胚細胞腫瘍(intratubular germ cell neoplasia unclassified; ITGCNU)が前駆病変と考えられている。非セミノーマの発生に関しては、ITGCNU から胎児性癌に分化し、さらに奇形腫、卵黄嚢腫瘍、奇形腫へと多段階的に分化していくという説と、ITGCNU からセミノーマになり、セミノーマから非セミノーマに分化するという説が存在する(図1)^{3,7}。これらの経路に関与する分子生物学的機序については未だ十分に解明されていない部分もあるが、胚細胞由来であることに起因する特徴的な分子発現は明らかになっている。なかでも多分化能維持に必要な転写因子である Oct3/4 はセミノーマと胎児性癌で発現し、Sox2 は胎児性癌で発現することから、セミノーマと胎児性癌は分化能を持つと考えられている⁸。また、精巣腫瘍において 12 番染色体短腕の重複が非常に高頻度に検出されることが知られ、

腫瘍との関連が示唆されている^{9, 10}。一方で、小児(思春期前)に発生する精巣腫瘍は成人と異なり、組織型は奇形腫と卵黄嚢腫瘍が多数を占める^{11, 12}。また、その発生には成人の精巣腫瘍とは異なり 12p や ITGCNU は関連しないとされており、未だ十分には解明されていない¹³。

1-3 病理学的診断

精巣腫瘍の各組織型は形態学的に診断可能な場合もあるが、判断が困難な場合もある。特にセミノーマと胎児性癌は、前者で核異型が強い場合や腺腔状構造が見られる場合は後者との鑑別が困難な場合が多いとされる¹⁴。この点は、臨床的にセミノーマと胎児性癌が最も頻度の高い組織型であることから重要である。そのために表5に示すような分子マーカーの免疫組織化学染色所見を参考にする場合も多い¹⁵。この場合、臨床病理学的には AFP、HCG、c-kit、CD30 などが鑑別に使用される。特にセミノーマでは c-kit 陽性、CD30 陰性であり、胎児性癌では c-kit 陰性、CD30 陽性であることが重要である。

1-4 DNA メチル化

エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現や細胞表現型を制御し伝達する機構のことを指し¹⁶、代表的なものとして DNA のメチル化が知られている。DNA メチル化とは、遺伝子プロモーター領域の CpG 繰り返し配列のシトシンがメチル化され 5-methyl-cytosine(5mc)に置換されることを指し、維持型メチル化酵素 DNA methyltransferase (DNMT)1、新規メチル化酵素 DNMT3A・DNMT3B、そのコファクターである DNA methyltransferase 3-like (DNMT3L)によっ

て制御されていることがわかっている。DNA メチル化が起きると転写が抑制され、遺伝子発現に大きな影響を与えることが明らかになり、これまでに膵癌、大腸癌、乳癌、白血病など、多数の悪性腫瘍において、DNMT の高発現が認められ¹⁷⁻²⁰、癌抑制遺伝子の不活化が報告されている^{21, 22}。一方で、DNA を脱メチル化する機構も徐々に明らかになってきており、その一つとして Ten-eleven translocation (TET) タンパク質ファミリーが 5mC をヒドロキシル化し 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) に変換し、さらに 5-formylcytosine (5fC)、5-carboxylcytosine (5caC) に酸化し、塩基除去修復が行われることで脱メチル化を行う経路が提唱されている^{23, 24}。TET2 の機能異常が血液系腫瘍で、またこの経路に関与するイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH)1/2 の変異が様々な悪性腫瘍で認められ²⁵、多くの悪性腫瘍で 5hmC の低下が報告されている²⁶。このように、悪性腫瘍の発生や進展において、様々なエピジェネティック異常が関与していることが明らかになり、DNMT 阻害剤による脱メチル化治療²⁷が行われるなど、治療のターゲットとしても有用性が期待されている。

精巣腫瘍の発生や組織分化においてもエピジェネティック異常の重要性は注目されており、特にセミノーマと非セミノーマの各組織型では DNA メチル化パターンが大きく異なることが明らかにされてきた。非セミノーマはセミノーマと比較して高度にメチル化されたパターンであり、高分化になるほど高頻度にメチル化されていることが示されている²⁸⁻³²。このことから、セミノーマから非セミノーマへ発展や分化にはエピジェネティックな変化が寄与している可能性があると考えられている。

種々のエピジェネティクス関連分子の中で DNMT3L は酵素活性を持たないものの新規 DNA メチル化酵素である DNMT3A と DNMT3B の活性を促進する働きをもち³³、特に胚細胞の成熟の過程で重要な役割を果たすことが知られている³⁴。精巣

腫瘍との関連では最近、胎児性癌細胞株の増殖に必須な分子であること、さらには免疫組織化学染色で胎児性癌の組織において特異的に高発現することが示され注目されている³⁵。一方で、公開されているマイクロアレイ解析データベース the Oncomine Expression Array Data (www.oncomine.com)では、DNMT3L 遺伝子は胎児性癌以外の他の組織型においても高発現する症例が存在することが示されている(図 2)。

2 研究の目的

以上に述べてきたように DNA メチル化はセミノーマから非セミノーマへの進展カスケードに重要な役割を果たしていると考えられる。DNMT3L の発現やその役割については胎児性癌での研究が先行し、胎児性癌に特異的に発現し、その増殖に必須であると報告されている³⁵。一方で、マイクロアレイ解析データベースでは DNMT3L の mRNA がセミノーマや卵黄嚢腫瘍などにも発現していることが示されている。この乖離の要因は明らかではないが、現状では DNMT3L のさまざまな病型や病期の精巣腫瘍での網羅的な発現解析が十分ではないことも事実である。たとえば、セミノーマの病期 I 症例と転移例での発現の違いや単一組織型のセミノーマと混合型として他の組織型と混在して存在するセミノーマ成分での発現の違い、さらに、頻度は少ないものの血清 AFP 上昇を伴うセミノーマでの DNMT3L 発現などについては明らかにされていない。また胎児性癌以外の非セミノーマでは、これまで絨毛癌組織における DNMT3L 蛋白の発現の有無についての報告はない。さらに、成人例とは異なり大部分が単一組織型の奇形腫か卵黄嚢腫瘍であり、かつ発生機序が成人例と異なるとされる小児の精巣腫瘍における知見も十分ではない。

そこで今回、研究1では各々の組織型について単一型／混合型、局所性／進行性、あるいは青壮年期／思春期前発症などの種々の病型を考慮にいった組織マイクロアレイ(TMA)及び新規精巣摘出標本を用いて精巣腫瘍における DNMT3L 蛋白の発現について検討し、臨床情報も含めて分析した。また、グローバルなメチル化状態を検出するために 5mc・5hmc の発現を検討した。研究2では胚細胞腫瘍細胞株を用いて DNMT3L の発現とその機能について、RNA 干渉法(RNAi) を利用して解析を行った。

3 研究1・精巣腫瘍における DNMT3L タンパクの免疫組織学的検討

3-1 対象と方法

材料

1987 年から 2009 年までの間に、筑波大学附属病院腎泌尿器外科(65 例)あるいは関連施設(龍ヶ崎済生会病院および日立製作所ひたちなか総合病院からそれぞれ1例)で高位精巣摘除術が行われ、原発精巣腫瘍組織がパラフィンブロックとして保存されている 67 名の精巣腫瘍患者の病理材料を用いた。67 名の患者から、86 サンプルを抽出し、解析対象とした。今回使用した症例の詳細を表 6、7 に示す。我々の研究室では、先行研究にて精巣腫瘍摘出標本より組織マイクロアレイ(TMA)を作成していた(図 3)³⁶。この TMA より 64 名の患者、83 サンプルの組織を使用した。さらに、血清 AFP 高値であったが、原発精巣の病理組織診断は単一型セミノーマであった 3 症例の精巣摘出標本を解析対象に加えた。

単一型精巣腫瘍は 43 例であり、そのうち 23 例がセミノーマ、8 例が胎児性癌、7 例が奇形腫、4 例が卵黄嚢腫瘍であり、絨毛癌は 1 例のみであった。23 例のセミノーマのうち、10 例は病期 I であり、残りの 13 例は病期 II 以上の進行例であった。混合型精巣腫瘍は 24 名の患者より計 43 例の様々な組織型の検体を対象とした。胎児性癌成分が 18 例と最も多く、セミノーマ成分が 11 例、奇形腫成分 7 例、卵黄嚢腫瘍成分 4 例、絨毛癌成分が 3 例であった。混合型精巣腫瘍の 24 名の患者のうち、12 名は病期 I であったが、残りの 12 名は進行例であった。

病理標本となった原発精巣は全症例が化学療法や放射線治療前に摘出されており、初診時年齢の中央値は 31 歳(0-51 歳)、単一型卵黄嚢腫瘍の 3 名と単一型奇形腫の 5 名は思春期前(0-10 歳)の発症であった。病理検体の収集、利用につ

いては筑波大学附属病院の倫理委員会の承認を得て同意の得られているものを使用した。年齢、病期診断、血液検査等、臨床情報は後方視的に医療記録を参照した。

免疫組織化学染色

TMAは先行研究において作成したものを使用した(図3)³⁶。TMAは、手術検体を10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋されて保存されていた腫瘍検体より、それぞれの症例の1組織型あたり任意の領域を3コアずつ長径2mmの円柱状に切り抜き、48コアを再包埋して1ブロックとして作成した。スライドはTMAより4μm厚に薄切して作成した。血清AFP高値であったが、原発精巣の病理組織診断はセミノーマであった3症例については保存されているパラフィンブロックを薄切し、スライドを作成した。DNMT3Lの一次抗体は、滋賀医科大学 岡本圭生先生より譲渡していただいたウサギポリクローナル抗体を使用した。その他の一次抗体はCD30 (M0751, Dako)、SOX2 (#3579 Cell Signaling)、AFP (clone ZSA06, Nichirei Biosciences)、c-kit (A4502, Dako)、5mc (NA81, Calbiochem)、5hmc (39769 active motif) を用いた。DNMT3L 蛋白の免疫染色は、脱パラフィン処理、脱水処理後にクエン酸緩衝液を用いてマイクロウェーブで21分間、抗原賦活化処理を行った。0.3% H₂O₂メタノールで室温にて30分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。1:100で希釈した1次抗体に一晚4℃で反応させ、2次抗体(Histofine Simple Stain MAX PO®、Nichirei Bioscience)に30分浸したのちDAB溶液で発色させた。ヘマトキシリンにて核染色を行い、脱水、透徹、封入を行った。CD30、AFP染色はつくばヒト組織診断センター(THDC)に依頼した。

DNMT3L免疫染色の判定は染色強度と範囲によって3段階(-、+、++)に判定した。 -:negative、+:partially positive (染色強度が弱 and /or $\leq 20\%$ に強陽性)、++: strong positive ($>20\%$ の腫瘍細胞に強陽性)とした。TMAについては、臨床情報をブラインドにして標本の評価を行った。

統計解析

統計解析ソフトは JMP10 (SAS Institute, Cary, NC)を用いた。群間の比較にはフイッシャーの正確検定を用いた。 $p < 0.05$ で統計的有意とした。

3-2 結果

図 4 に単一型精巣腫瘍、混合型精巣腫瘍それぞれの各組織型について、DNMT3L の染色結果を示した。

胎児性癌

DNMT3L は、胎児性癌の単一型では 87.5% (7/8)、混合型では 88.9% (16/18) の症例で陽性を示し、陽性例の 91.3% (21/23) は強陽性であった(図 4)。典型的な染色例を図 5 に示す。広範囲に胎児性癌細胞の核に強陽性を示した。SOX2 は単一型では 62.5% (5/8)、混合型では 88.9% (16/18) で陽性を示した。SOX2 は広範囲に細胞核で陽性となった。一方 CD30 は細胞膜が染色され、単一型では 75.0% (6/8)、混合型で 88.9% (16/18) で陽性を示した。

胎児性癌以外の組織

以下の胎児性癌以外の組織型において、セミノーマ、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌では CD30 及び SOX2 が共に陰性、奇形腫では CD30 が陰性であることを確認した上で解析を行った。

セミノーマ

まず単一型セミノーマについて解析した。セミノーマのマーカーである c-kit は全例で陽性であった。

単一型セミノーマでは 73.9% (17/23) は DNMT3L 陰性であったが(図 4、6)、6 例で陽性(+)を示した。これら 6 例全例が病期 II 以上の進行例であり、そのうち 3 例は血清 AFP 上昇例であった。陽性例では、散在性に少数の細胞の核が染色されたが、

胎児性癌のように広範囲に腫瘍細胞が強く染色される症例は認めなかった。血清 AFP 陽性セミノーマの1例の病理像を図 7,8 に示す。ヘマトキシリンエオジン染色では単一型セミノーマの診断であり、他の組織型を特定することはできなかった(図 7)。DNMT3L 染色では大部分のセミノーマ細胞は陰性であるが、限局性に陽性細胞が認められた(図 8)。本症例は AFP も限局性に陽性を示していたが、連続切片にて AFP と DNMT3L の染色をおこなったところ、AFP 陽性細胞の存在部位と DNMT3L 陽性細胞の存在部位は同じ領域であった(図 8)。

混合型のセミノーマ成分では 36.4% (4/11)の症例で局所性、散在性に陽性を示した(図 9)。単一型セミノーマと同様、広範囲に強く染色される症例は認めなかった。陽性の 4 例のうち、3 例は病期 II 以上の進行例であったが、1 例は病期 I の限局癌であった。

卵黄囊腫瘍

単一型卵黄囊腫瘍 4 例、混合型精巣腫瘍の卵黄囊腫瘍成分 4 例に対し検討を行った。単一型卵黄囊腫瘍は 3 例が思春期前発症であった。単一型卵黄囊腫瘍では 4 例とも陽性(2 例が強陽性)であった(図 10)。混合型の卵黄囊腫瘍成分では陽性例は認めなかった。

絨毛癌

単一型絨毛癌は 1 例のみ、混合型精巣腫瘍の絨毛癌成分では 3 例が解析可能であり、結果として DNMT3L は 4 例全例で陽性であった。混合型精巣腫瘍の絨毛癌成分の 3 例中 2 例で強陽性(++) (図 11)、単一型絨毛癌1例及び混合型精巣腫瘍の絨毛癌成分の1例では腫瘍細胞に淡く陽性(+)を示した。

奇形腫

単一型奇形腫は 7 例あり、DNMT3L は 6 例で陽性(うち1例は強陽性)であった。単一型奇形腫には 5 例の思春期前発症例が含まれた。これらの思春期前発症例の 4 例が弱陽性であった。混合型の奇形腫成分は 7 例を対象に解析したが、4/7 で弱陽性(+)であった。陽性例では軟骨様細胞や腺組織に陽性像を認めた(図 12)。

病期 I 症例と進行症例における DNMT3L 陽性率 (図 13)

セミノーマ

単一型セミノーマ 23 例を病期 I と病期 II 以上で層別した。DNMT3L は病期 I の症例ではすべて陰性であった。一方で病期 II 以上の症例では 46.2% (6/13)で陽性(+)を示し、病期 I と比較し、有意に高率であった($p=0.019$)。

混合型精巣腫瘍

混合型精巣腫瘍の病期 I の症例では 83.3% (10/12)が DNMT3L 陽性(+ or ++)であった。一方で病期 II 以上の症例では 64.3% (9/14)で陽性(+ or ++)を示し、混合型精巣腫瘍では病期による陽性率の差は認めなかった。

5mc と 5hmc の免疫組織化学的解析 (表 8、図 14 および図 15)

全般的な DNA メチル化状態を解析するために 5mc・5hmc の免疫染色を行った(表 8)。血清 AFP 陽性セミノーマの1症例と混合型のセミノーマ成分の1症例、計2例は腫瘍部位の検体不足により解析対象から除外した。

単一型セミノーマの 91.9% は 5mc・5hmc とともに陰性であった(図 14A)。血清 AFP

陽性セミノーマの 2 例は 5mc、5hmc が弱く染色されたが、DNMT3L のように局所的ではなく、切片全体に散在していた(図 14B)。非セミノーマのセミノーマ成分では 5hmc 陽性が 3 例認められ、そのうち 2 例は DNMT3L 陽性症例と同一であった(図 14C)。

非セミノーマ成分については、胎児性癌と奇形腫では 5mc・5hmc がともに高率に陽性であった(胎児性癌がそれぞれ 92.3%、100%。奇形腫が 85.7%、100%)(図 15A、D)。胎児性癌で 5mc 陰性であった 2 例はいずれも DNMT3L 陰性であった。卵黄嚢腫瘍においては、5mc は 8 例中 2 例であり、1 例は病期 I 単一型の症例で DNMT3L も陽性であったが(図 15B。図 10 と同一症例)、もう 1 例は病期 II 以上の混合型の症例で DNMT3L は陰性であった。5hmc は 87.5% (7/8 例)で陽性を示した。絨毛癌では単一型の 1 例のみ、5mc・5hmc とともに陰性であったが、混合型の 3 例はともに陽性を示した。

3-3 考察

本研究では免疫組織化学染色を用いて DNMT3L が高頻度に単一型、および混合型精巣腫瘍に含まれる胎児性癌に発現することを示したが、これは過去の報告と一致していた³⁵。さらにセミノーマ、および卵黄嚢腫瘍、絨毛癌、奇形腫の一部にも DNMT3L が発現していることを示した。

単一型セミノーマにおける DNMT3L 発現

DNMT3L は単一型セミノーマの 26.1% (6/23)において陽性を示した。しかし、DNMT3L が陽性であるのは病期 II 以上の進行例に限られ、病期 I 症例においては認めなかった。結果として病期 II 以上の症例に限定すると DNMT3L 陽性率は 46.1% であった。セミノーマにおける DNMT3B の発現については Arai ら³⁷ が、DNMT3B の原発巣での発現を免疫組織化学的に検討し、病期 I 及び II 症例での発現率が 36% 及び 39% なのに対して病期 III 症例では 100% と高いこと、及び病期 I 症例を無治療で経過観察した場合した場合 DNMT3B 陽性例 25 例中 6 例 (24%) が転移で再発したのに対して陰性例 45 例の再発率が 6.7%に留まることを報告した。非セミノーマでは、病期 I 症例の経過観察中における再発を予測するリスク因子として脈管侵襲の有無が重要とされているが^{38, 39}、セミノーマでは再発リスク評価法が確立していないことから後者の知見は臨床的に重要と考えられる。DNMT3L 自体は酵素活性を持たないが、コファクターとして DNMT3A や DNMT3B の活性を増強することが知られている。我々はセミノーマでの DNMT3L の発現が病期 II 以上の症例に限定されることを示したが、これは DNMT3L あるいは DNMT3L と DNMT3B を併せて原発巣発現を解析することで、より有効に病期 I 症例の再発リスクを評価できることを示唆しているかもしれない。筑波大学及びその関連施設では最近まで病

期Ⅰセミノーマでは再発予防目的の放射線照射を選択してきたため、今回はこの点に関して直接検討できなかった。これについては今後の重要な研究テーマであると考えている。

血清 AFP 陽性セミノーマにおける DNMT3L 発現

原発巣ではセミノーマの組織像しか認められないにもかかわらず、血清 AFP が高値を示す場合、AFP 陽性セミノーマとして臨床的には通常のセミノーマとしてではなく非セミノーマとして扱われ治療が進められる。一方で、AFP 陽性セミノーマに対して化学療法施行後に残存した後腹膜リンパ節を摘除した場合、通常の非セミノーマより癌細胞が残存する率が高いとされ、非セミノーマよりむしろ悪性度が高いとする報告もある⁴⁰。一般的には、AFP 陽性セミノーマの原因としては、1) 原発巣に AFP を産生する卵黄嚢腫瘍や胎児性癌などの組織が存在したが微量のため病理学的に判定できない、2) 原発巣はセミノーマのみであったが転移巣で他の組織型に分化した、などの機序が考えられている^{40, 41}。今回、我々が検討した AFP 陽性セミノーマの 3 例では高位精巣摘除後も AFP 高値が遷延したため、転移巣に血清 AFP 高値となる原因となる非セミノーマ成分が存在したのは明らかである。しかし 1 例では図 7, 8 に示すように原発巣においても AFP 産生細胞が存在し、なおかつ形態的には周囲のセミノーマ細胞と区別できなかった。更に興味深いことには、その領域には DNMT3L 細胞も散在していた。これらの所見から、この DNMT3L 陽性セミノーマは形態的にはセミノーマではあるが、AFP 産生能を有するなど生物学的には非セミノーマへ移行しつつある細胞である可能性がある。このような病理学的にセミノーマと非セミノーマの中間型の病型がありえりとする報告もあるが、現状では知見は十分ではなく今後の更なる検討が必要である⁴²。一方で、細胞レベルではセミノ

ーマが胎児性癌へ移行する過程において DNMT3L 及び DNMT3B が重要な役割を果たしていることを示唆する報告がある。Nettersheim らはセミノーマ由来培養細胞株である TCam-2 を用いた in vivo モデルにおいて、TCam-2 を接種し皮下転移を作成すると胎児性癌様に分化進展することを示し、さらにその際に腫瘍組織において DNMT3L や DNMT3B の発現が増強することを明らかにしている⁴³。

非セミノーマにおける DNMT3L の発現

我々は本研究で胎児性癌以外の組織型でも、一部の症例に DNMT3L が発現していることを見出した。まず混合型精巣腫瘍の構成成分別に見てみるとセミノーマ成分では 36.3%、奇形腫では 57.1%、絨毛癌成分では 100%で DNMT3L が陽性であった。特に絨毛癌成分では高率に陽性であり、単一型絨毛癌は臨床的に非常に稀なため本研究では 1 例のみの検討ではあるが、その 1 例も DNMT3L は陽性であった。これまで、絨毛癌での DNMT3L のタンパク質レベルの発現解析については報告がなかったが³⁵、Nettersheim らは、胎盤由来のヒト絨毛癌の培養細胞株において、DNMT3L の mRNA が高発現することを報告しており、我々の結果を支持するものと考えられる⁴³。

今回の検討で少数例ではあるが思春期前精巣腫瘍での DNMT3L の発現を検討し興味深い知見を得た。一般的に思春期前に発症する精巣腫瘍は単一型の奇形腫あるいは卵黄囊腫瘍であることが多く、これらは type I 胚細胞腫と分類され、青壮年期に発症するセミノーマや非セミノーマ(type II 胚細胞腫)とは分けて考えられている³。type I 胚細胞腫は稀なことから、その発生機序などについてはまだ基礎的知見も少ない。この点に関して Furukawa らは思春期前胚細胞腫瘍の癌抑制遺伝子のメチル化状態を解析し、卵黄囊腫瘍はセミノーマや奇形腫に比べて高頻

度にメチル化されていることを報告している⁴⁴。我々の今回の検討では(成人発症、即ち type II 胚細胞腫の)混合型卵黄囊腫瘍では DNMT3L は全て陰性であった。対照的に、単一型卵黄囊腫瘍の症例では4例全例で DNMT3L の発現を認めた。これら4例のうち、3例は思春期前発症例であった。一方で卵黄囊腫瘍とは異なり、奇形腫では思春期前症例の単一型奇形腫と、混合型の奇形腫成分での陽性率に違いは見られなかった。これらの結果は type I 胚細胞腫の卵黄囊腫瘍の発生機序に癌抑制遺伝子のメチル化が重要であり、さらにその過程に DNMT3L 蛋白の発現が関与していることを示唆するものと考えられる。

5mc と 5hmc の免疫組織化学的解析

DNA 新規メチル化は DNMT3 ファミリーにより CpG ジヌクレオチドのシトシン 5 位の炭素にメチル基を付加して 5mC とすることによって起こる。一方で、脱メチル化機構により 5mc は 5hmc を経て 5fC や 5caC へと変換され脱メチル化される機序が明らかになってきている^{23, 24, 45}。今回の実験ではゲノム全体の DNA メチル化レベルを検討するため 5mc の免疫染色を行い、非セミノーマの組織型においては高率に 5mc 陽性であったが、単一型セミノーマでは低い(陽性率<10%) 結果となった。これらの結果は Nettersheim らの報告⁴³と同様の傾向であった。また、5mc の脱メチル化による中間産物である 5hmc の免疫染色では混合型のセミノーマ成分では 30%の陽性率を示し、非セミノーマの組織型においては高率に陽性であった。セミノーマにおいては 90%以上の症例で 5hmc がさらに酸化された 5fC, 5caC が発現しており、脱メチル化酵素の TET タンパク質ファミリーが様々な組織型の胚細胞腫瘍および細胞株で発現していることが報告されている⁴³。これらの事実からセミノーマ、非セミ

ノーマに関わらず、メチル化機構と脱メチル化機構が相互的に関与していることが推察される。今回、DNMT3L の発現と 5mc の発現は一部の症例で一致するものの、明らかな関連性を見出すことはできず、脱メチル化機構の影響も検討する必要がある。また、免疫染色では特定のゲノム領域のメチル化状態を知ることは困難であり、さらに分子生物学的手法での網羅的解析が必要と考えられた。

4 研究 2・胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L タンパクの発現とその機能についての検討

研究1において、免疫染色での DNMT3L の発現が複数の組織型で認められることが明らかとなった。研究 2 では胚細胞腫瘍由来細胞株における DNMT3L タンパクの発現を検討し、その発現が細胞株の形質に与える影響を明らかにすることを目的とした。胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L タンパク発現はウェスタンブロットにより解析した。また、DNMT3L タンパク発現が細胞の分化ステータスや癌抑制遺伝子の発現、細胞の生存に与える影響については、RNAi 法による DNMT3L 発現抑制細胞を用いて定量 PCR による遺伝子の発現解析や、増殖、浸潤・遊走能の検討を行った。

4-1 対象と方法

細胞培養

精巣由来ヒト胎児性癌細胞株は NEC8 細胞、NEC14 細胞、NT2 細胞(理研より購入)および NCCIT 細胞(American Type Culture Collection[ATCC]より購入)、胎盤由来ヒト絨毛癌細胞株は JEG-3 細胞(ATCC より購入)、卵巣由来奇形腫細胞株は Hs 38.T 細胞(ATCC より購入)を用いた。NEC8 細胞、NEC14 細胞、NCCIT 細胞は RPMI 1640、NT2 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)、JEG-3 細胞は Eagle's Minimum Essential Medium、Hs 38.T 細胞は DMEM 培地を用い、それぞれの培地には 10% fetal bovine serum を加え、37℃、5%CO₂ 環境下のインキュベータで培養した。

ウェスタンブロット

培養細胞を氷冷した radio-immunoprecipitation assay buffer (RIPA バッファー) (1.5×10^{-2} mol/L Tris-HCl [pH 7.5], 0.1% sodium dodecyl sulfate, 2×10^{-3} mol/L NaCl, 2×10^{-2} mol/L ethylenediamine tetraacetic acid, 1% [v/v] TritonX-100 and 1% [w/v] sodium deoxycholate) を加えて溶解し 12000g で 20 分間遠心し、回収した上清にサンプルバッファーを加え 5 分間ボイルしたものをサンプルとした。10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、タンパク質を分離した。ゲル上のタンパク質を Hybond-P PVDF メンブレン (GE ヘルスケアジャパン社) にセミドライ式転写を行った。ブロッキング溶液 2% (w/v) ECL Prime Blocking Reagent (GE ヘルスケアジャパン) を含む Tris-buffered saline Tween20 (TBS-T) にメンブレンを室温にて 30 分間浸透しブロッキングを行った後、ブロッキング溶液で 1/1000 倍に希釈した DNMT3L 一次抗体 (免疫染色と同じ抗体を使用) と 4°C にて一晩反応させた。続いてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ二次抗体と室温にて 1 時間反応させ、chemiluminescence 試薬 (ECL Prime Western blotting Detection Reagent) を用いてイメージアナライザー LAS4000 (Fujifilm) にて化学発光を検出した。DNMT3L は分子量 43kD であり、過去の報告で NEC8 細胞での発現が明らかになっていたことから³⁵、NEC8 細胞をポジティブコントロールとし、タンパク発現を検討した。

RNA 干渉(RNAi)による遺伝子発現抑制

NEC8 細胞 (1×10^5 cells/well/2000 μ l) を 6 well プレートに分注し、一晩培養したのち DNMT3L-siRNA (Stealth RNAi™ Thermo Fisher Scientific) およびネガティブコントロールである scramble-siRNA (Stealth RNAi™ Thermo Fisher Scientific) を導入試薬

Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いて製品プロトコールに従いトランスフェクションをおこなった。

48 時間後に細胞を回収し、細胞溶解バッファー (RIPA バッファー)を用いてタンパクを回収し、ウェスタンブロット法による DNMT3L タンパク発現抑制効果の確認を行った。内標準タンパク質として β -actin の発現も検討し、ImageJ ソフトウェア (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いて、発現量の数値化を行った。

定量 PCR

siRNA トランスフェクションから 48 時間後に RNA 抽出試薬 (Trizol, Invitrogen 社)を用いて、細胞から RNA を抽出した。この RNA より High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社)を用いてプロトコールに従い逆転写反応を行い、cDNA を調製した。定量 PCR は cDNA に各遺伝子検出プライマーと Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems 社)を添加し、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system を用いて、PCR 反応を行った(標準プロトコールは Holding Stage 95°C・30 秒、Cycling Stage は 95°C・3 秒、60°C・30 秒を 40 サイクル)。発現量は比較 Ct 法にて比較した。検出プライマーは PrimerPlus3 を用いて設計した(表 9)。分化マーカーとして SOX2、NANOG、AFP を、精巣腫瘍においてメチル化が認められると報告されている癌抑制遺伝子として O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) 遺伝子、Ras-association domain family 1 isoform A (RASSF1A) 遺伝子、adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子、hypermethylated in cancer 1 (HIC1) 遺伝子、breast cancer 1, early onset (BRCA1) 遺伝子^{28, 46}の発現について解析した。

細胞増殖アッセイ

96 ウェルプレートに NEC8 細胞を 2000 cells/well の濃度になるよう計数し、100 μ l ずつ播種し 24 時間培養後に前述の RNAi 法により DNMT3L の発現抑制を行った。48 時間後、72 時間後にそれぞれのウェルに 10 μ l ずつ Cell Counting Kit-8 (Dojindo 社) を添加し 3 時間インキュベータ内で呈色反応を行い、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定した。各群 9 ウェルずつ測定し、最大値と最小値を除外した 7 ウェルの平均値と標準偏差を算出し比較した。

創傷治癒アッセイ

24 ウェルプレートに NEC8 細胞を撒き、80%コンフルエントで siRNA をトランスフェクションし、48 時間後、100%コンフルエントになった時点で 200 μ l チップの先でスクラッチし、PBS で洗浄し、浮遊細胞を除去し、経時的に間隙に細胞が遊走する状態を観察し、Control と発現抑制細胞で比較するアッセイを行った。

マトリゲル浸潤アッセイ

BD Bio Coat Matrigel invasion chamber (24 ウェル) (日本 BD 社) を使用し、プロトコール通り行った。インサート及びコンパニオンプレートのウェルに無血清の RPMI 1640 培地を添加し 2 時間水和した後、コンパニオンプレートのウェルに 10% の血清入りの培地を 500 μ l ずつ加え、インサートをセットした後、細胞を 500 μ l の無血清培地に懸濁しインサートに加えた。22 時間後にインサートを取り出し、内側の非浸潤細胞を綿棒で除去した後、Diff-Quick 染色液を用いて浸潤細胞を染色し、顕微鏡にて 100 倍で観察し、1 ウェルあたり任意の 3 箇所浸潤細胞数を測定した。

4-2 結果

(1) 6種類の胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L タンパクの発現解析

ウェスタンブロットによるタンパク発現解析において、精巣由来胎児性癌細胞株である NEC8 細胞、NEC14 細胞、胎盤由来絨毛癌 JEG-3 細胞では発現が認められたが、胎児性癌細胞株の NT2 細胞と NCCIT 細胞、奇形腫細胞株の Hs 38.T 細胞では発現が認められなかった(図 16)。

(2) DNMT3L の発現抑制が分化ステータスに与える影響

組織型により DNMT3L の発現が異なることが明らかになった。セミノーマ、胎児性癌は多分化能を持ち、一方で奇形腫は高分化であり、組織型により分化ステータスが異なることがわかっているが、DNMT3L が分化に関与しているかどうか検討するために、RNAi 法を用いて、DNMT3L を抑制した NEC8 細胞を作成した。そして、組織型の特有の分子マーカーの遺伝子発現を解析し、DNMT3L の発現抑制が分化ステータスに与える影響を検討した。

NEC8 細胞において、DNMT3L は RNAi によってタンパクレベルで 73.8% の発現抑制効果が得られた(図 17)。セミノーマ、胎児性癌に高発現する多分化能マーカーである NANOG、胎児性癌に特異的に高発現する SOX2、非セミノーママーカーである AFP の mRNA 発現レベルを DNMT3L 発現抑制 NEC8 細胞とコントロールとを定量 PCR 法にて比較したが、発現量の差を認めなかった(図 18)。また、精巣腫瘍においてメチル化が報告されている癌関連遺伝子についても同様に検討を行った。HIC1、RASSF1A、SCGB3A1 は NEC8 細胞において発現が低値であり解析できなかった。APC、BRCA1、MGMT は DNMT3L の発現抑制による有意な発現量の変化は認めな

かった(図 19)。

(3) DNMT3L の発現抑制が NEC8 細胞の形質に与える影響

DNMT3L を高発現する胎児性癌をはじめとする非セミノーマは、セミノーマと比較して増殖能が高い。また、DNMT3L 陽性であったセミノーマ 6 例はいずれも転移例であり、病期 I 症例ではすべて陰性であった。そこで、DNMT3L の発現は増殖や遊走浸潤を促進するという仮説を立て、DNMT3L の発現抑制を行い細胞の形質への影響を検討した。

1) 細胞増殖アッセイ

NEC8 細胞に scramble siRNA と DNMT3L siRNA をトランスフェクションし、48 時間、72 時間に吸光法にて細胞増殖能を比較した(図 20A)。DNMT3L 発現抑制細胞の増殖能の低下は認められなかった。

2) 創傷治癒アッセイ

DNMT3L 発現胚細胞腫瘍株(NEC8、NEC14、JEG-3)はいずれも接着細胞であるが、非常に剥がれやすく、剥がさずに洗浄することが難しいことや、スクラッチした境界から細胞がシート状に捲り上がってしまうため、本方法では正確に経時的な評価をおこなうことが困難であり、本方法での検討は中止した。

3) マトリゲル浸潤アッセイ

DNMT3L 発現抑制株を用いる前に、DNMT3L 高発現株 NEC8 細胞と DNMT3L 低発現株である NCCIT 細胞について浸潤アッセイを行った。まず、プロトコールに沿って 1 ウェルあたり 2.5×10^4 個を 1 ウェルに播種し、22 時間後に浸潤細胞を計測したが 1 群あたり 3 ウェルの (1 ウェルあたり任意の 3 箇所の視野) の平均が NEC8 細胞 7 個、

NCCIT 細胞は 5 個と非常に少数であった(図 20B)。DNMT3L 発現抑制 NEC8 細胞で浸潤能が抑制されることを仮説としていたため、未処置の NEC8 細胞の浸潤性が無いことや、ウェル内での細胞浸潤が不均一であり、細胞数のカウントによる評価は客観性に欠けると考えられたため、発現抑制株を用いて本方法での浸潤能の検討することは断念した。

4-3 考察

胚細胞腫瘍細胞株の DNMT3L タンパクの発現検討では胎児性癌細胞株では NEC8 細胞、NEC14 細胞で高発現し、絨毛癌細胞株 JEG-3 細胞でも高発現していた。胚細胞腫瘍細胞株の DNMT の mRNA 発現を解析し、DNMT3L は胎児性癌細胞株 JEG-3 細胞, JAR 細胞で高発現していることが過去に報告されている⁴³。これらの報告や、ウェスタンブロットの結果は、研究 1 の免疫染色の検討において、絨毛癌でも DNMT3L が高発現していたことを支持する結果と考えられる。

NEC8 細胞の DNMT3L の RNAi による一時的な発現抑制細胞ではコントロール細胞と比較して多分化能を示す SOX2、NANOG の発現量の変化を認めなかった。ES 細胞でも DNMT3L を shRNA で発現抑制しても NANOG、OCT3/4、SOX2 の発現変化が無いとされており⁴⁷、今回が siRNA を用いた短期間の DNMT3L 発現抑制のみであったため、多分化能への影響はないものと考えられた。また、精巣腫瘍においてメチル化が認められる癌関連遺伝子として MGMT 遺伝子、RASSF1A、APC 遺伝子、HIC1 遺伝子、BRCA1 遺伝子などが報告されているが、精巣腫瘍では他の悪性腫瘍に比較するとメチル化されている頻度は低く、報告により結果も様々である^{28, 29, 46, 48, 49}。今回の実験は RNAi での DNMT3L 発現抑制を行ったが、これらの候補遺伝子の発現変化は認めなかった。

DNMT3 ファミリーは新規メチル化を担う分子であり、一方で脱メチル化を起こす機構は様々な経路が提唱されているが、主に能動的な脱メチル化機構と、受動的な脱メチル化機構が存在することが知られている⁵⁰。能動的経路として、塩基除去修復経路を介する 5mc を酸化して 5hmc に変換する機能をもつ TET タンパク質ファミリーや 5mc をチミンに変換する activation-induced deaminase(AID)及び apolipoprotein B mRNA

editing enzyme catalytic polypeptides(APOBEC)の関与が報告されている⁴⁵。受動的な DNA 脱メチル化機構には、DNA 複製に依存する経路で DNA メチル化維持を担う DNMT1 が抑制され、次第にメチル化の低下を引き起こすことが知られている。今回は DNMT3L の RNAi 法による発現抑制であり、メチル化の変化は確認していないが、これらの脱メチル化の機序を考慮すると、今回の実験のような DNMT3 ファミリーの補因子である DNMT3L の一時的な抑制のみで、DNA メチル化状態が短期間でダイナミックな脱メチル化を起こすことは考えにくい。そのため、DNMT3L の機能の抑制による遺伝子発現への影響を検証するには恒常的な抑制モデルを用いる必要があると考えられる。

一方で Hela 細胞に DNMT3L を過剰発現させ長期的に継代すると、次第に SOX2 を発現し、形質が変化することや⁵¹、セミノーマ様細胞 T-Cam2 細胞をマウスに接種すると、胎児性癌に分化するとともに DNMT3L、DNMT3B の発現量が増加することが報告されている⁴³。したがって、胚細胞腫瘍細胞株においても DNMT3L タンパクを強制発現させることや、分化誘導することにより、メチル化の促進と関連した分化や悪性化に関与する遺伝子発現の変化が生じる可能性がある。

今回の実験では DNMT3L 発現抑制細胞で増殖能の低下も認められなかった。Minami らは siRNA による DNMT3L の抑制により、DNMT3L 高発現細胞株である NEC8 および NEC14 で細胞増殖抑制、およびアポトーシスを認めたことを報告していた³⁵。今回行った実験と結果が異なった理由として、過去の報告より今回の実験では遺伝子抑制効果が低かった可能性が挙げられる。また、今回の研究では試した siRNA が1種類のみであることや、細胞増殖の測定方法が異なっていた。しかし NT2 細胞や NCCIT 細胞など、DNMT3L 低発現の胎児性癌細胞株も存在することが明らか

となっていることから、胎児性癌における DNMT3L の発現意義の解明には、恒常的な発現抑制、および強制発現系を含めた再検証が必要と考えられる。

5 本研究の限界と今後の展望と予定

今回の研究では免疫染色で DNMT3L の組織型に特徴的な発現を見ることが出来たが、標本数も少なく、さらに症例を増やして検討していく必要がある。免疫組織学的解析ではホルマリン固定条件や、固定後の保存条件、保存年数など様々な要因で判別に影響が出ている可能性が否定できない。また、免疫染色では定量的な評価は難しく、新鮮凍結検体を用いた発現解析を合わせて検討していく必要がある。しかし、混合型精巣腫瘍であった場合、凍結検体を採取する際に、病理診断前に肉眼的に組織型を同定することが難しいため、マイクロダイセクション法などで病理診断後に標的組織のみを採取できれば、さらに組織特異的な解析ができると考えられる。

また、今回の実験では細胞レベルで精巣腫瘍の分化や悪性化における DNMT3L の発現の意義を十分に明らかにするまでは及ばなかった。胚細胞腫瘍細胞株の扱いに慣れるのに時間がかかり、細胞によっては非常に剥離しやすく、増殖が一定でなく止まることが度々あるなど、各々の実験の条件検討に困難をきたした。一部の胎児性癌細胞株は多分化能を有し、*in vitro* でレチノイン酸や hexamethylene bisacetamide (HMBA) で処理することにより分化することが知られている。この分化モデルや、DNMT3L およびエピジェネティクス関連分子の過剰発現細胞を用いて、分化や悪性化に関わる分子、TET を含む脱メチル化に関する分子を経時的に発現を解析することや、細胞形態を観察することにより、今回明らかにできなかった精巣腫瘍の発生と分化、難治化における DNMT3L の機能についての理解が進むことが期待される。

近年、診断時転移を認めない病期 I セミノーマの精巣摘除術後の管理法として無治

療経過観察が普及しつつある。しかし、この場合約 15%の症例が転移で再発する^{52, 53}。従って、精巣摘除標本の免疫組織学的解析で転移のリスクが高い症例を選別できれば再発予防を行うことが可能となり大変有用と考えられる。そこで、これまでのエピジェネティクス関連分子の報告、および今回の研究で得た知見である、DNMLT3L が転移を有する症例でのみ発現することを利用し、無治療経過観察で再発した症例と再発しなかった症例での DNMLT3L をはじめとするエピジェネティクス関連分子の免疫組織化学的発現解析を行い分子マーカーとして有用性を検討する臨床研究を計画し倫理委員会の承認を得ている。今後、症例数を増やし、解析を進めることにより、再発のリスク評価に資する有用な分子マーカーを同定できれば、リスクに応じた個別的な管理ができる可能性がある。

6 総括

本研究では精巣腫瘍の各組織型における DNMT3L タンパクの発現を検討した。胎児性癌だけでなく、一部のセミノーマ、絨毛癌でも陽性を認めることを示した。胎児性癌と単一型卵黄嚢腫瘍では高率に陽性であり、単一型セミノーマでは進行例でのみ局所的に認められた。これらの結果から DNMT3L は胎児性癌だけではなく、セミノーマの分化進展や、単一型卵黄嚢腫瘍の発生においても必要な分子である可能性がある。しかし、その機能については未だ十分に明らかでなく、胎児性癌細胞株 NEC8 における検討では DNMT3L の短期間の発現抑制のみでは分化や悪性化への影響は認められず、恒常的な発現制御による解析がさらに必要である。DNMT3L をはじめとするエピジェネティクス関連分子の精巣腫瘍における役割を明らかにすることで、精巣腫瘍に対するメチル化の制御による治療への応用や化学療法耐性のメカニズムへの理解が進むことが期待される。

7 謝辞

本研究において、御指導及び御校閲を賜った筑波大学人間総合科学研究科 西山博之教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究遂行にあたって直接御指導いただいた筑波大学人間総合科学研究科、河合弘二先生に深い謝意を表します。また、日頃の議論を通じて多くの知識や示唆をいただいた腎泌尿器外科研究室の皆様に感謝いたします。

8 引用文献

1. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. IARC Scientific Publications. IARC, Lyon: 578, 2009
2. van Dijk, M. R., Steyerberg, E. W., Habbema, J. D.: Survival of non-seminomatous germ cell cancer patients according to the IGCC classification: An update based on meta-analysis. *Eur J Cancer*, **42**: 820, 2006
3. Oosterhuis, J. W., Looijenga, L. H.: Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*, **5**: 210, 2005
4. Sobin LH, G. M., Wittekind C: TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Wiley-Blackwell. Hoboken, NJ, 2009
5. 日本泌尿器科学会編: 精巣腫瘍取扱い規約 第3版 金原出版. 東京, 2005
6. International Germ Cell Cancer Collaborative Group: International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. *J Clin Oncol*, **15**: 594, 1997
7. van de Geijn, G. J., Hersmus, R., Looijenga, L. H.: Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **87**: 96, 2009
8. Gopalan, A., Dhall, D., Olgac, S. et al.: Testicular mixed germ cell tumors: a morphological and immunohistochemical study using stem cell markers, OCT3/4, SOX2 and GDF3, with emphasis on morphologically difficult-to-classify areas. *Mod Pathol*, **22**: 1066, 2009
9. Bosl, G. J., Ilson, D. H., Rodriguez, E. et al.: Clinical relevance of the i(12p) marker chromosome in germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst*, **86**: 349, 1994
10. Rodriguez, S., Jafer, O., Goker, H. et al.: Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene*, **22**: 1880, 2003
11. Oottamasathien, S., Thomas, J. C., Adams, M. C. et al.: Testicular tumours in children: a single-institutional experience. *BJU Int*, **99**: 1123, 2007
12. Hisamatsu, E., Takagi, S., Nakagawa, Y. et al.: Prepubertal testicular tumors: A

- 20-year experience with 40 cases. *Int J Urol*, **17**: 956, 2010
13. Reuter, V. E.: Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol*, **18 Suppl 2**: S51, 2005
 14. Ye, H., Ulbright, T. M.: Difficult differential diagnoses in testicular pathology. *Arch Pathol Lab Med*, **136**: 435, 2012
 15. Looijenga, L. H.: Human testicular (non)seminomatous germ cell tumours: the clinical implications of recent pathobiological insights. *J Pathol*, **218**: 146, 2009
 16. Wu, C., Morris, J. R.: Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*, **293**: 1103, 2001
 17. Robertson, K. D., Uzvolgyi, E., Liang, G. et al.: The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, **27**: 2291, 1999
 18. el-Deiry, W. S., Nelkin, B. D., Celano, P. et al.: High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 3470, 1991
 19. Girault, I., Tozlu, S., Lidereau, R. et al.: Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res*, **9**: 4415, 2003
 20. Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T. et al.: Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **97**: 1172, 2001
 21. Esteller, M.: Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, **358**: 1148, 2008
 22. Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R. et al.: Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*, **10**: 687, 2001
 23. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y. et al.: Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, **324**: 930, 2009
 24. Ito, S., Shen, L., Dai, Q. et al.: Tet proteins can convert 5-methylcytosine to

- 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, **333**: 1300, 2011
25. Vasanthakumar, A., Godley, L. A.: 5-hydroxymethylcytosine in cancer: significance in diagnosis and therapy. *Cancer Genet*, **208**: 167, 2015
 26. Ficiz, G., Gribben, J. G.: Loss of 5-hydroxymethylcytosine in cancer: cause or consequence? *Genomics*, **104**: 352, 2014
 27. Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A. et al.: DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*, **4**: 80, 2014
 28. Smith-Sorensen, B., Lind, G. E., Skotheim, R. I. et al.: Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer. *Oncogene*, **21**: 8878, 2002
 29. Honorio, S., Agathangelou, A., Wernert, N. et al.: Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene*, **22**: 461, 2003
 30. Brait, M., Maldonado, L., Begum, S. et al.: DNA methylation profiles delineate epigenetic heterogeneity in seminoma and non-seminoma. *Br J Cancer*, **106**: 414, 2012
 31. Smiraglia DJ, S. J., Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomäki P, Plass C.: Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. *Oncogene*, **21**: 3909, 2002
 32. Almstrup, K., Hoei-Hansen, C. E., Nielsen, J. E. et al.: Genome-wide gene expression profiling of testicular carcinoma in situ progression into overt tumours. *Br J Cancer*, **92**: 1934, 2005
 33. Wienholz, B. L., Kareta, M. S., Moarefi, A. H. et al.: DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo. *PLoS Genet*, **6**: e1001106, 2010
 34. Liao, H. F., Tai, K. Y., Chen, W. S. et al.: Functions of DNA methyltransferase 3-like in germ cells and beyond. *Biol Cell*, **104**: 571, 2012
 35. Minami K, Chano T, Kawakami T et al.: DNMT3L is a novel marker and is

- essential for the growth of human embryonal carcinoma. *Clin Cancer Res*, **16**: 2751, 2010
36. Ando, S., Matsuoka, T., Kawai, K. et al.: Expression of the oncoprotein gankyrin and phosphorylated retinoblastoma protein in human testis and testicular germ cell tumor. *Int J Urol*, **21**: 992, 2014
 37. Arai, E., Nakagawa, T., Wakai-Ushijima, S. et al.: DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. *Histopathology*, **60**: E12, 2012
 38. Albers, P., Siener, R., Kliesch, S. et al.: Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group Trial. *J Clin Oncol*, **21**: 1505, 2003
 39. Divrik, R. T., Akdogan, B., Ozen, H. et al.: Outcomes of surveillance protocol of clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors-is shift to risk adapted policy justified? *J Urol*, **176**: 1424, 2006
 40. Peterson, M., Beck, S., Bihle, R. et al.: Results of retroperitoneal lymph node dissection after chemotherapy in patients with pure seminoma in the orchidectomy specimen but elevated serum alpha-fetoprotein. *BJU Int*, **104**: 176, 2009
 41. Kundu, S. D., Carver, B. S., Sheinfeld, J.: Retroperitoneal histologic findings of patients with elevated serum alpha-fetoprotein and pure seminoma at orchiectomy. *Urology*, **78**: 844, 2011
 42. Looijenga, L. H., Gillis, A. J., Stoop, H. J. et al.: Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, **1120**: 187, 2007
 43. Nettersheim, D., Heukamp, L. C., Fronhoffs, F. et al.: Analysis of TET expression/activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development. *PLoS One*, **8**: e82881, 2013
 44. Furukawa, S., Haruta, M., Arai, Y. et al.: Yolk sac tumor but not seminoma or teratoma is associated with abnormal epigenetic reprogramming pathway and

- shows frequent hypermethylation of various tumor suppressor genes. *Cancer Sci*, **100**: 698, 2009
45. Song, C. X., Yi, C., He, C.: Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nat Biotechnol*, **30**: 1107, 2012
 46. Sanjay Koul, J. H., Mahesh M Mansukhani,, Alessia Donadio, J. M. M., Victor E Reuter, George J Bosl, Raju S Chaganti and Vundavalli V Murty: Characteristic promoter hypermethylation signatures in male germ cell tumors. *Mol Cancer*, 2002
 47. Neri, F., Krepelova, A., Incarnato, D. et al.: Dnmt3L antagonizes DNA methylation at bivalent promoters and favors DNA methylation at gene bodies in ESCs. *Cell*, **155**: 121, 2013
 48. Lind, G. E., Skotheim, R. I., Fraga, M. F. et al.: Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1). *J Pathol*, **210**: 441, 2006
 49. Kawakami, T., Okamoto, K., Kataoka, A. et al.: Multipoint methylation analysis indicates a distinctive epigenetic phenotype among testicular germ cell tumors and testicular malignant lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*, **38**: 97, 2003
 50. Ooi, S. K., Bestor, T. H.: The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, **133**: 1145, 2008
 51. Gokul, G., Ramakrishna, G., Khosla, S.: Reprogramming of HeLa cells upon DNMT3L overexpression mimics carcinogenesis. *Epigenetics*, **4**: 322, 2014
 52. Steiner, H., Holtl, L., Wirtenberger, W. et al.: Long-term experience with carboplatin monotherapy for clinical stage I seminoma: a retrospective single-center study. *Urology*, **60**: 324, 2002
 53. Warde, P.: Prognostic Factors for Relapse in Stage I Seminoma Managed by Surveillance: A Pooled Analysis. *J Clin Oncol*, **20**: 4448, 2002

9 図表

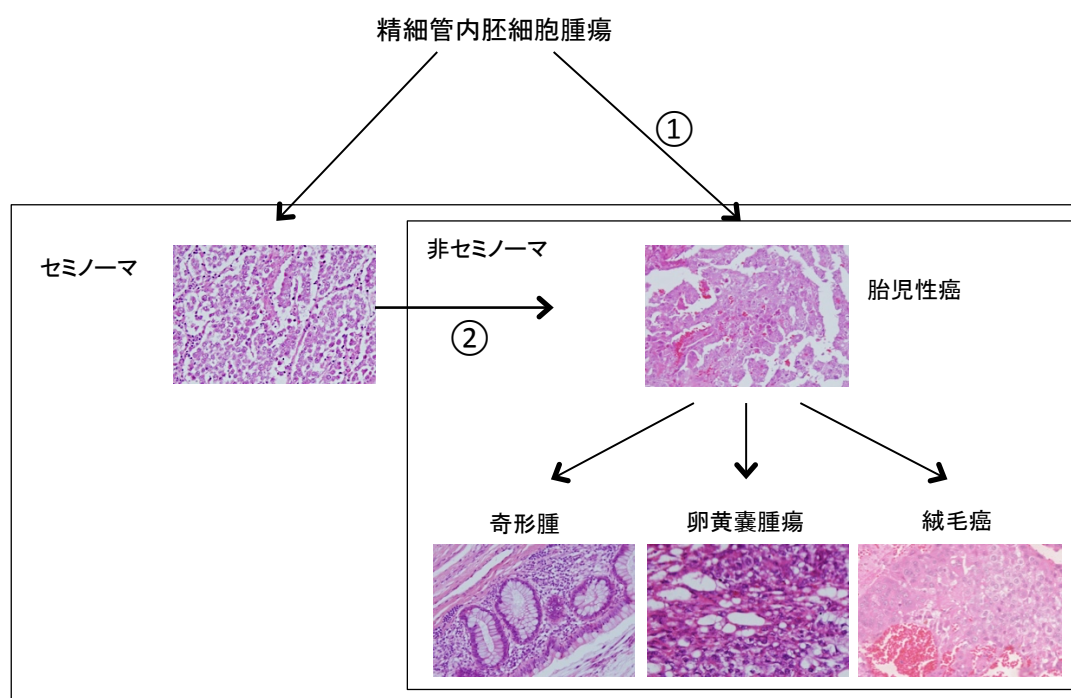
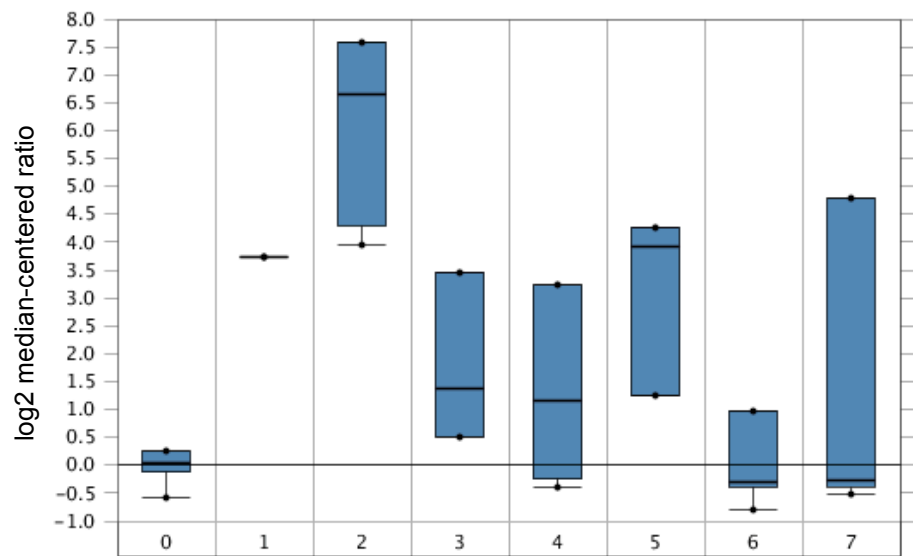


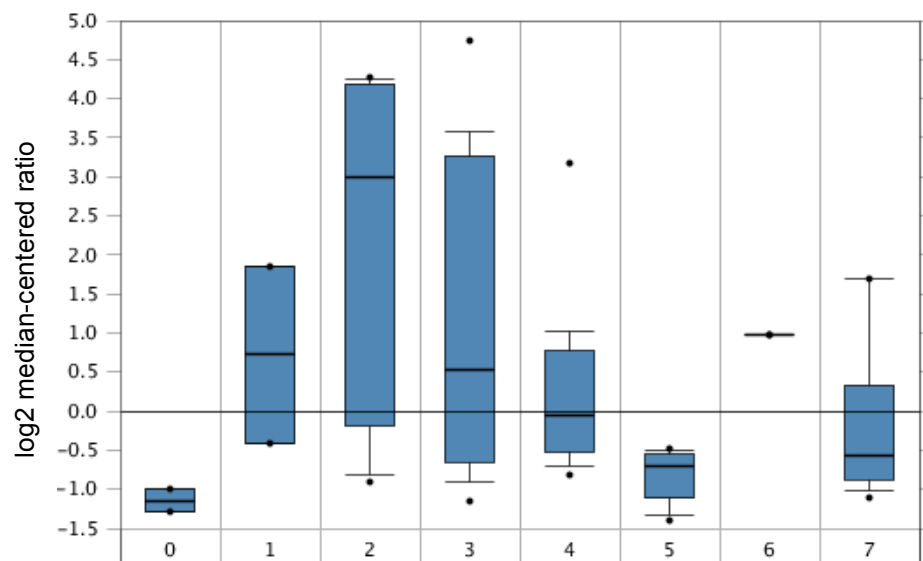
図 1 精巣腫瘍の組織型

主に5つに分けられる。胎児性癌の組織発生に関しては精細管内胚細胞腫瘍 (ITGCNU)からの進展 (経路①) とセミノーマからの re-programming (経路②) の2経路が存在するとされている。



Legend

- | | |
|--|--|
| 0. No value (4) | 4. Testicular Mixed Embryonal Carcinoma and Teratoma (6) |
| 1. Testicular Choriocarcinoma (1) | 5. Testicular Seminoma (3) |
| 2. Testicular Embryonal Carcinoma (5) | 6. Testicular Teratoma (4) |
| 3. Testicular Intratubular Germ Cell Neoplasia (3) | 7. Testicular Yolk Sac Tumor (4) |



Legend

- | | |
|------------------------------------|--|
| 0. No value (6) | 4. Seminoma, NOS (12) |
| 1. Choriocarcinoma (2) | 5. Teratoma, NOS (16) |
| 2. Embryonal Carcinoma, NOS (15) | 6. Testicular Seminoma with High Mitotic Index (1) |
| 3. Mixed Germ Cell Tumor, NOS (45) | 7. Yolk Sac Tumor, NOS (10) |

www.oncomine.com より改変

図 2 精巣腫瘍における DNMT3L の mRNA 発現率

Oncomine database の2つのデータセット(上図:Skotheim Testis、下図:Korkola)では胎児性癌の他の組織型でも高発現が認められている。

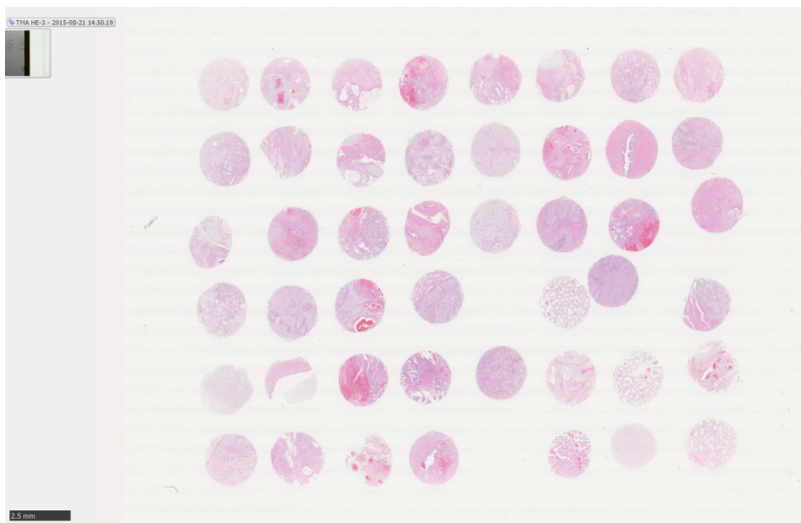


図 3 組織マイクロアレイ（ヘマトキシリンエオジン染色）

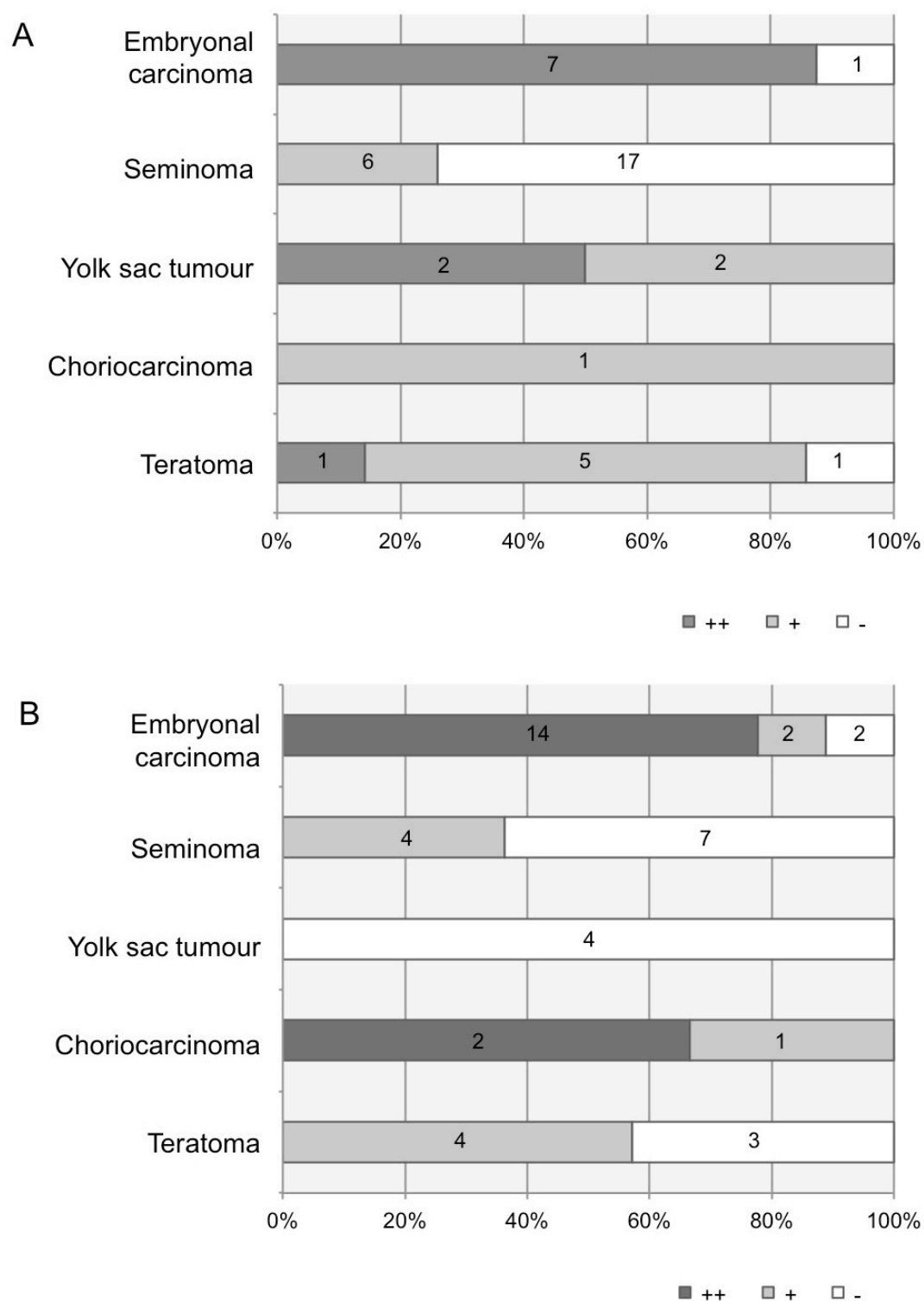


図 4 組織型による DNMT3L 陽性率の比較

A 単一型精巣腫瘍

B 混合型精巣腫瘍

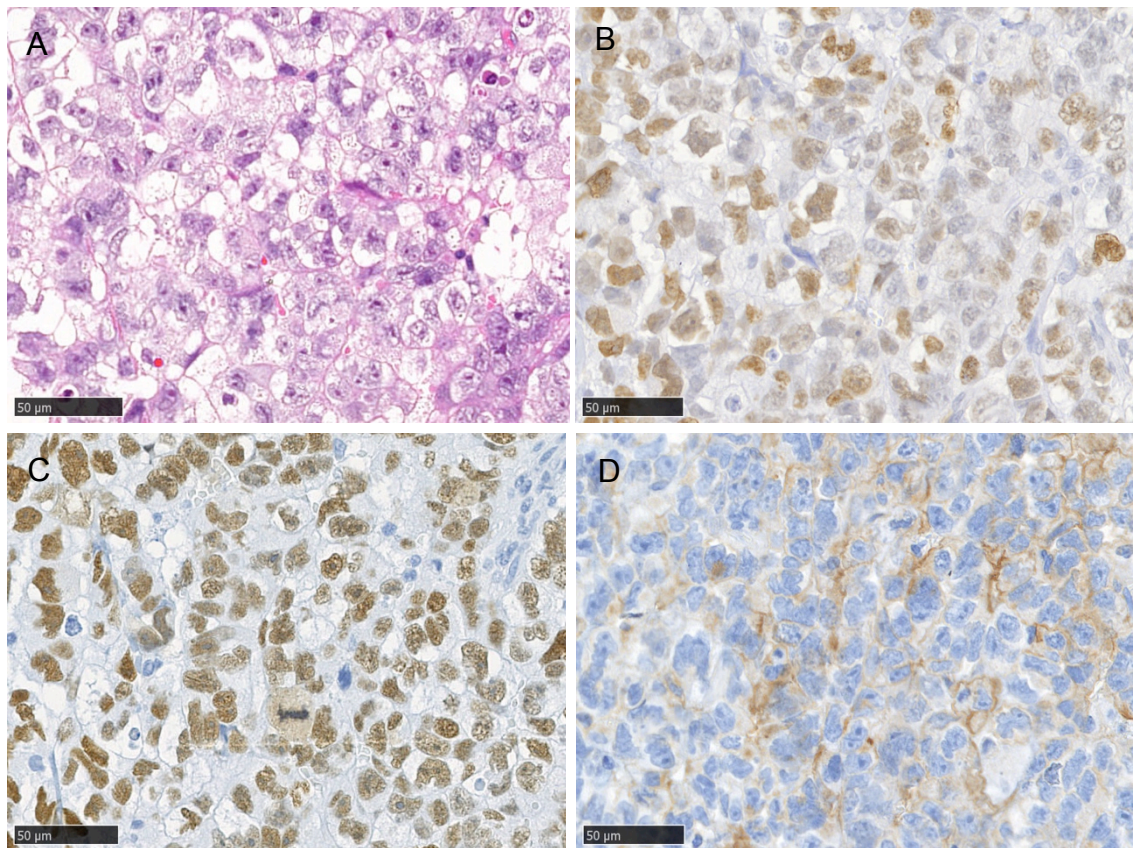


図 5 胎児性癌の免疫染色例

(A)HE (B)DNMT3L (C)SOX2 (D)CD30

大多数の腫瘍細胞において、DNMT3L、SOX2 は腫瘍細胞核、CD30 は細胞膜が染色されている。

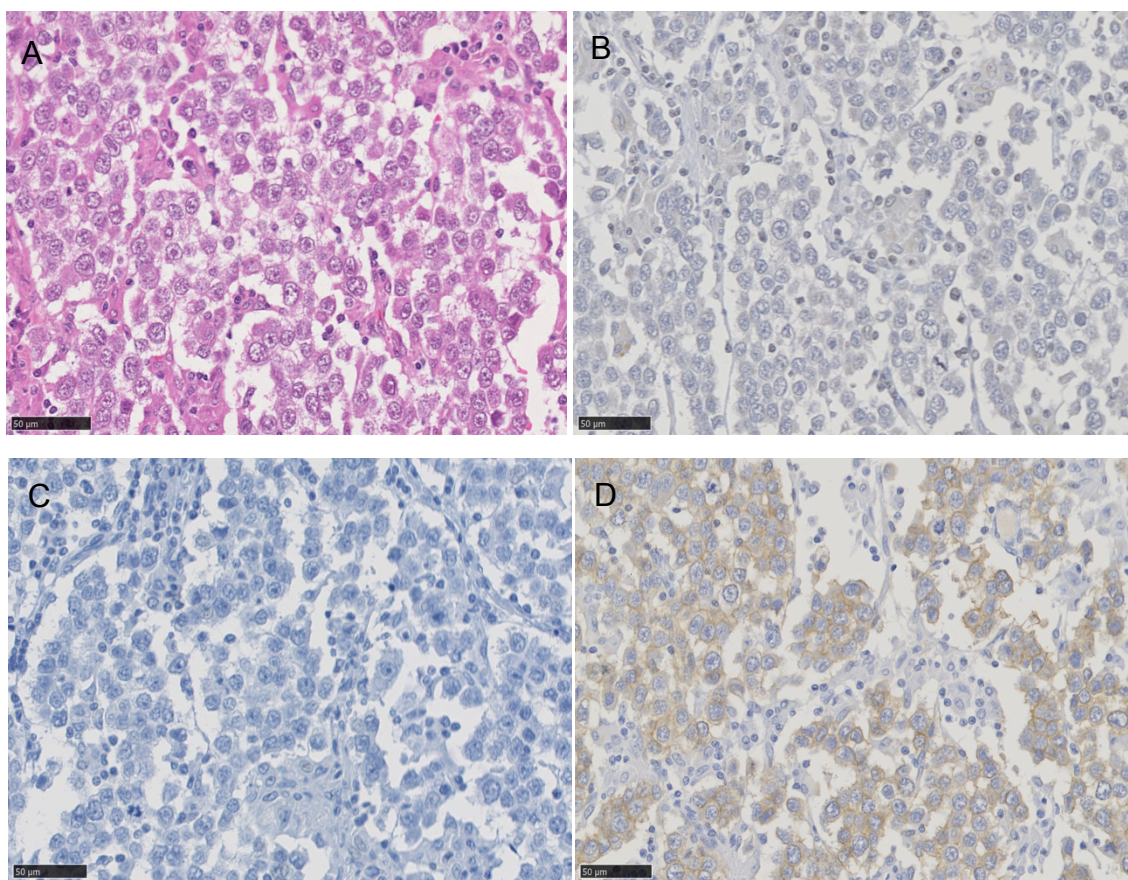


図 6 病期 I 単一型セミノーマの免疫染色例

(A)HE (B)DNMT3L (C)CD30 (D)c-kit

DNMT3L、CD30 は陰性、c-kit は細胞膜が染色されている。

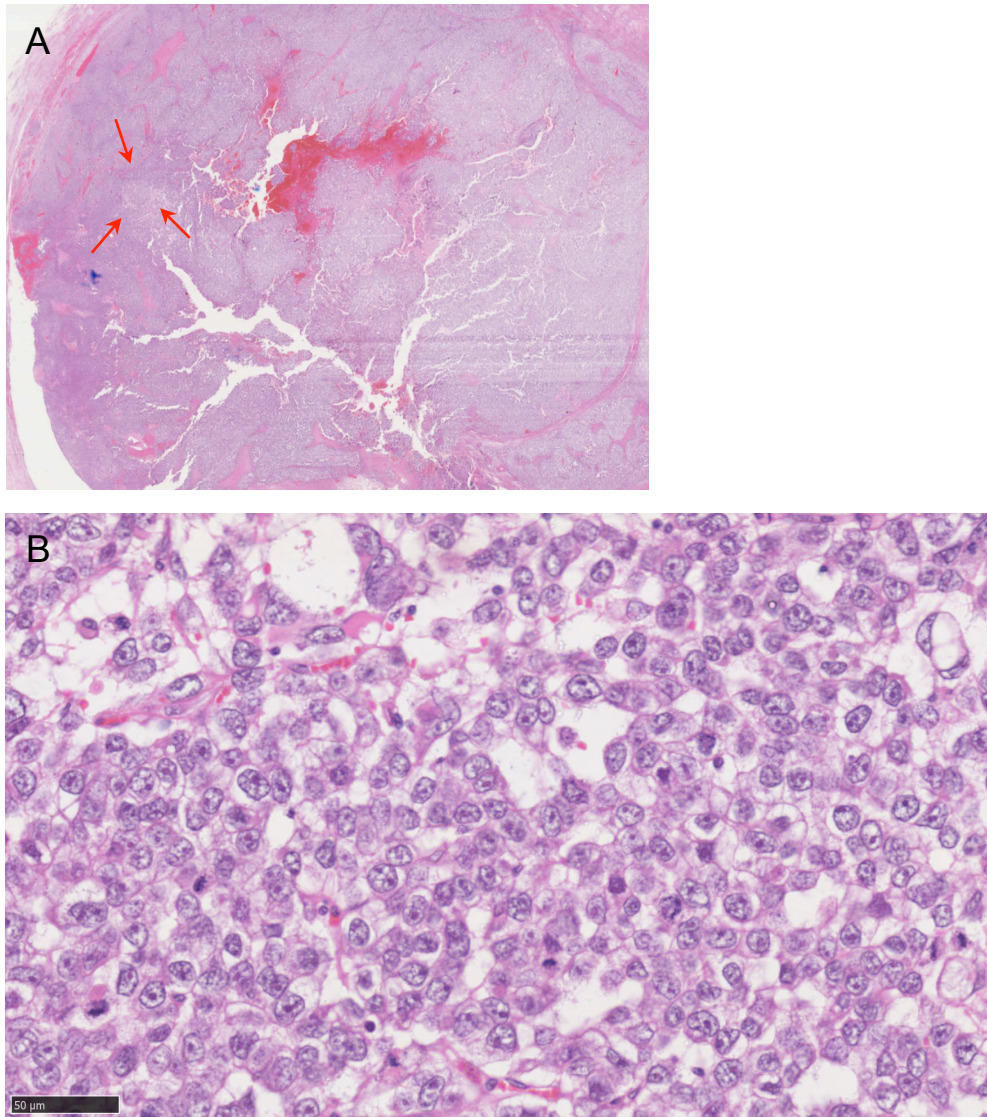


図 7 血清 AFP 上昇を伴うセミノーマの原発精巣の組織像

(A)HE 弱拡大 (B)DNMT3L 強拡大。

大型円形を示す腫瘍細胞が充実性に増殖。非セミノーマ成分は明らかでは無い。

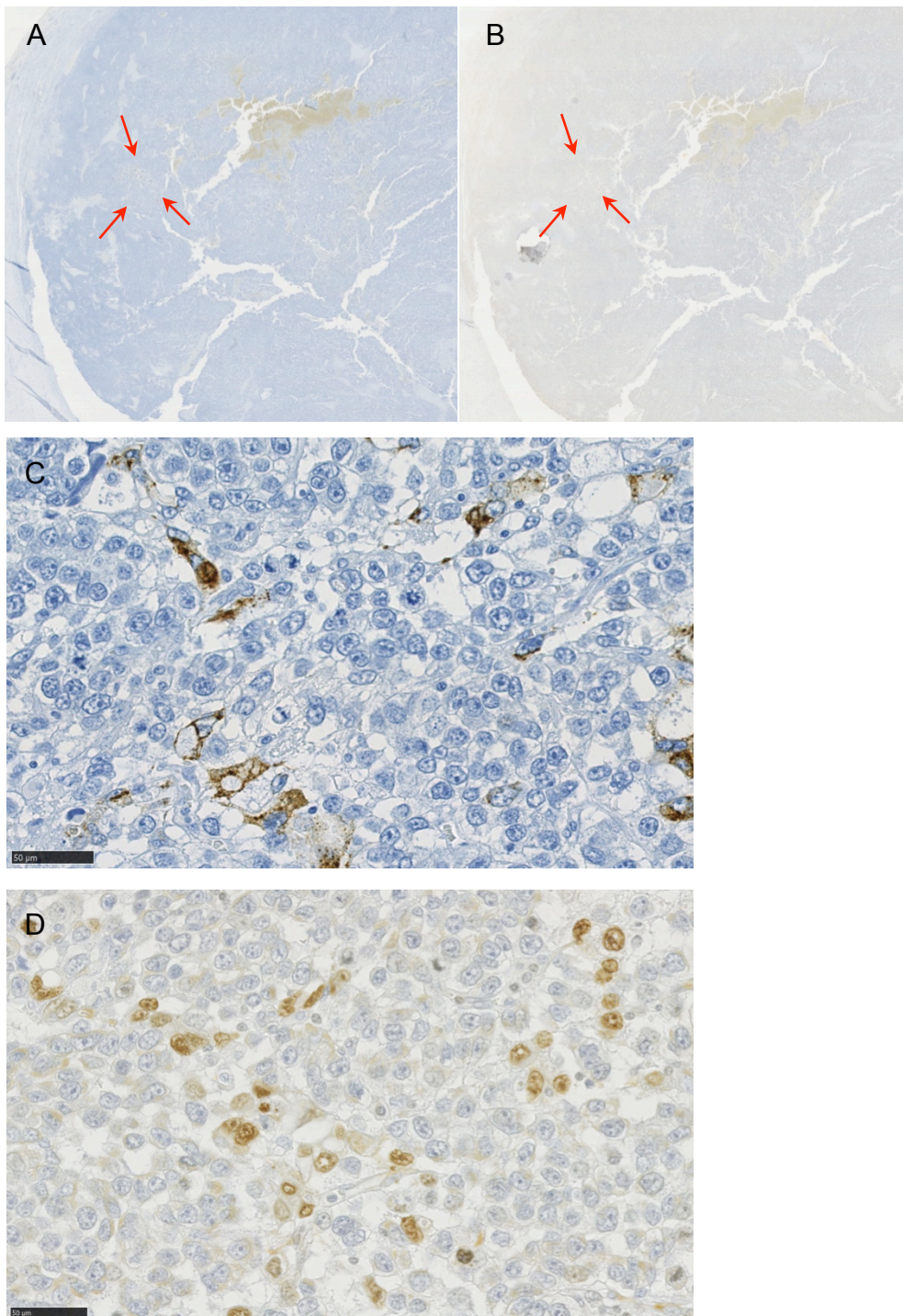


図 8 血清 AFP 上昇を伴うセミノーマの原発精巣の免疫染色
 (A)AFP, 弱拡大 (B)DNMT3L, 弱拡大 (C)AFP, 強拡大 (D)DNMT3L 強拡大。
 連続切片で染色。局所的に AFP 陽性細胞と DNMT3L 陽性細胞が存在する。

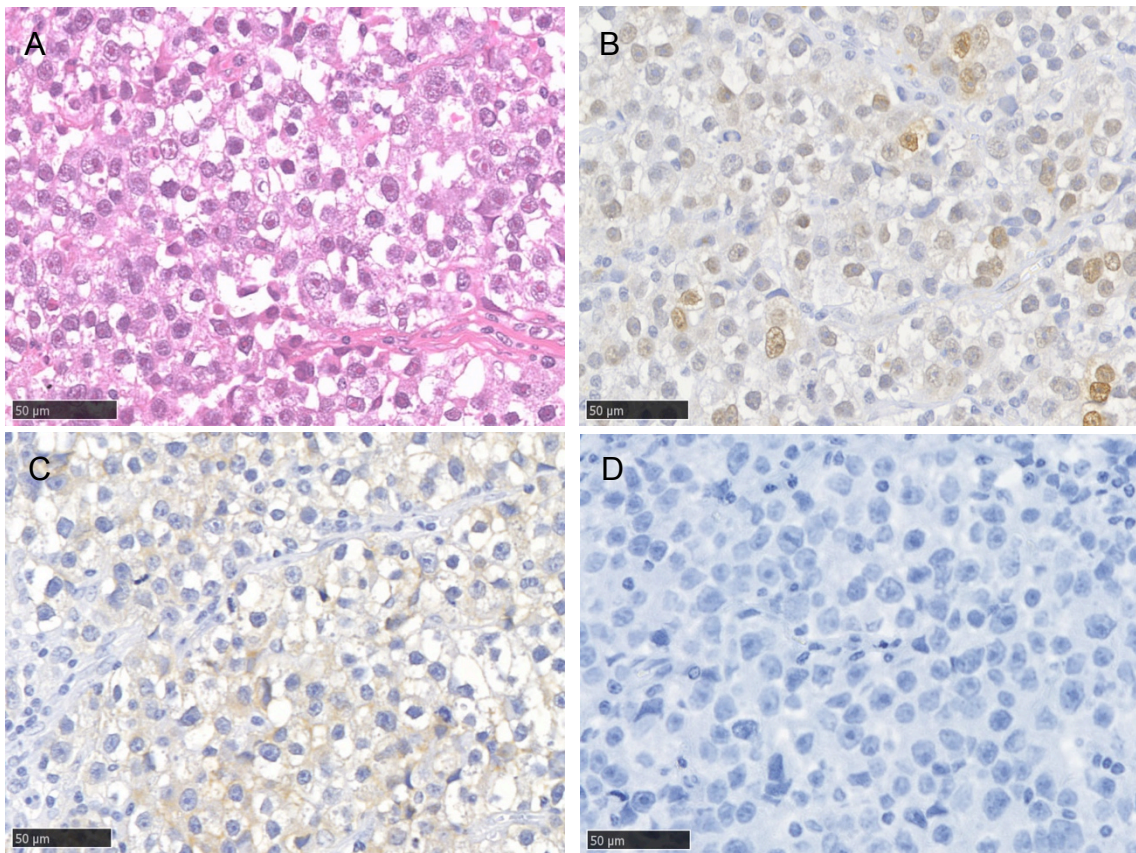


図 9 非セミノーマのセミノーマ成分の免疫染色例

(A)HE (B)DNMT3L (C)c-kit (D)CD30

細胞核が弱～強染色される腫瘍細胞が散在しているが、CD30 は陰性。

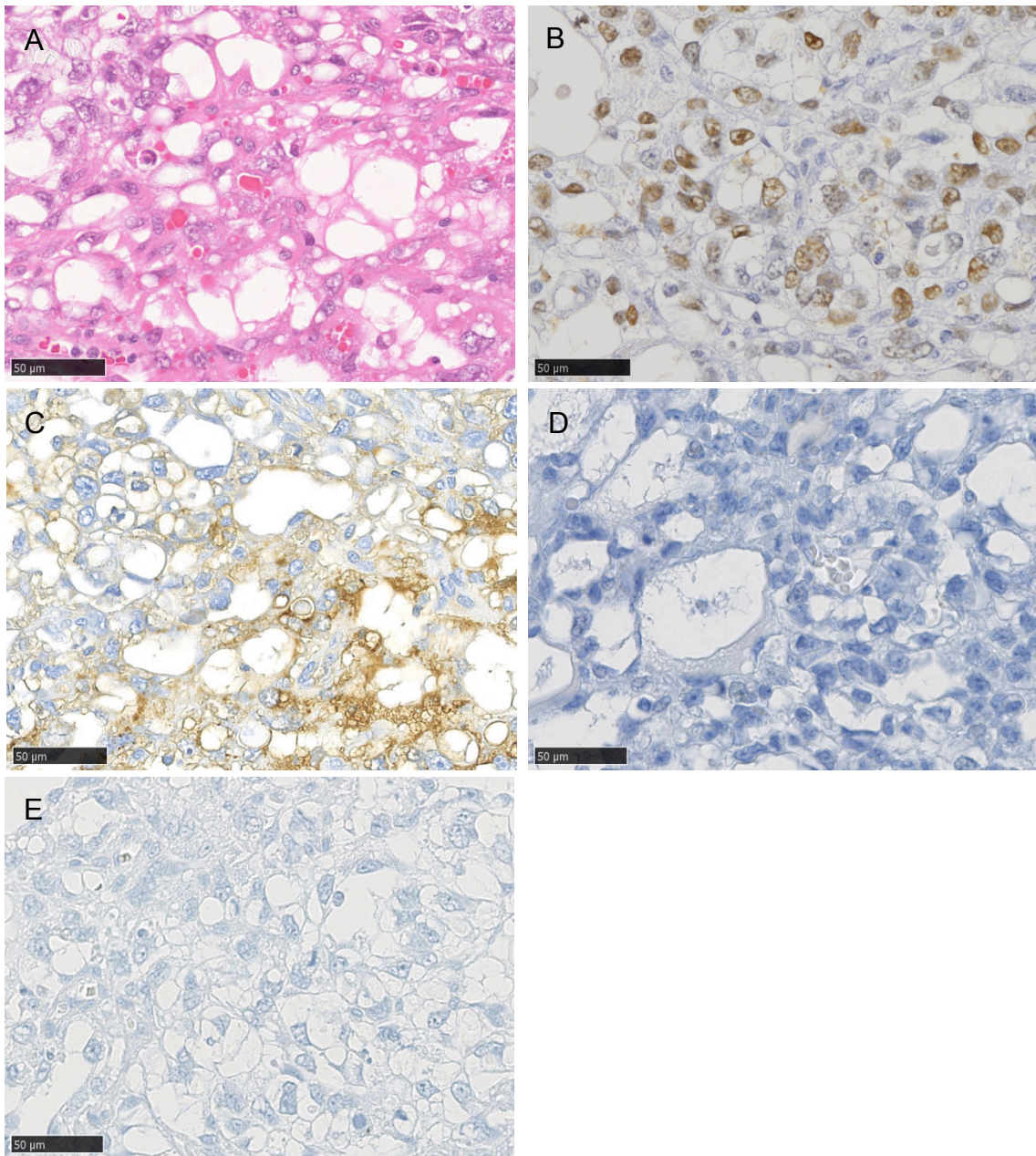


図 10 思春期前発症の単一型卵黄嚢腫瘍の免疫染色例

(A)HE (B)DNMT3L (C)AFP (D)CD30 (E)SOX2

AFP 染色では強陽性を示す。DNMT3L でも広範に腫瘍細胞の核が染色される。
CD30、SOX2 は陰性である。

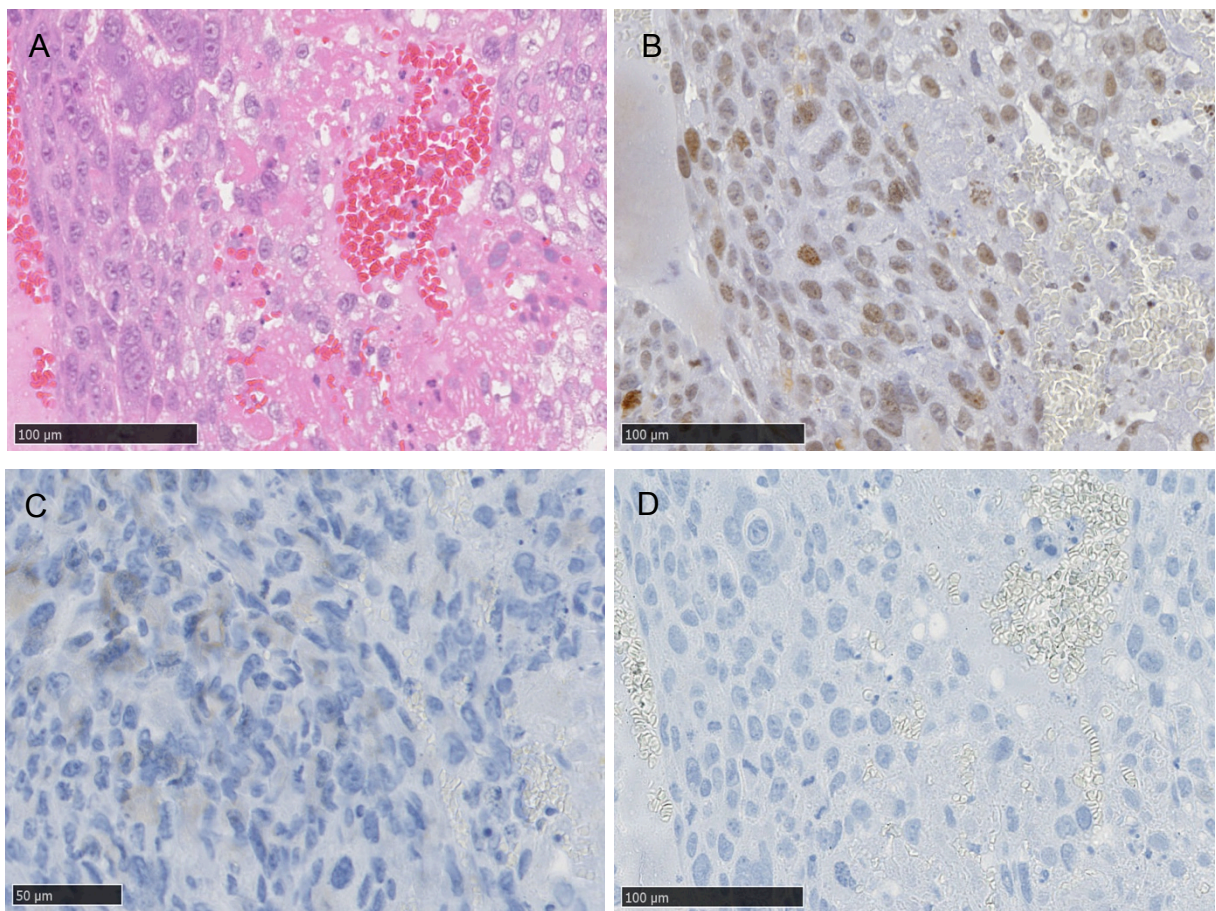


図 11 絨毛癌(混合型)の免疫染色例

(A)HE (B)DNMT3L (C)CD30 (D)SOX2

出血壊死を伴う腫瘍。腫瘍細胞で DNMT3L は広範囲に陽性を示すが、CD30、SOX2 では染色されない。

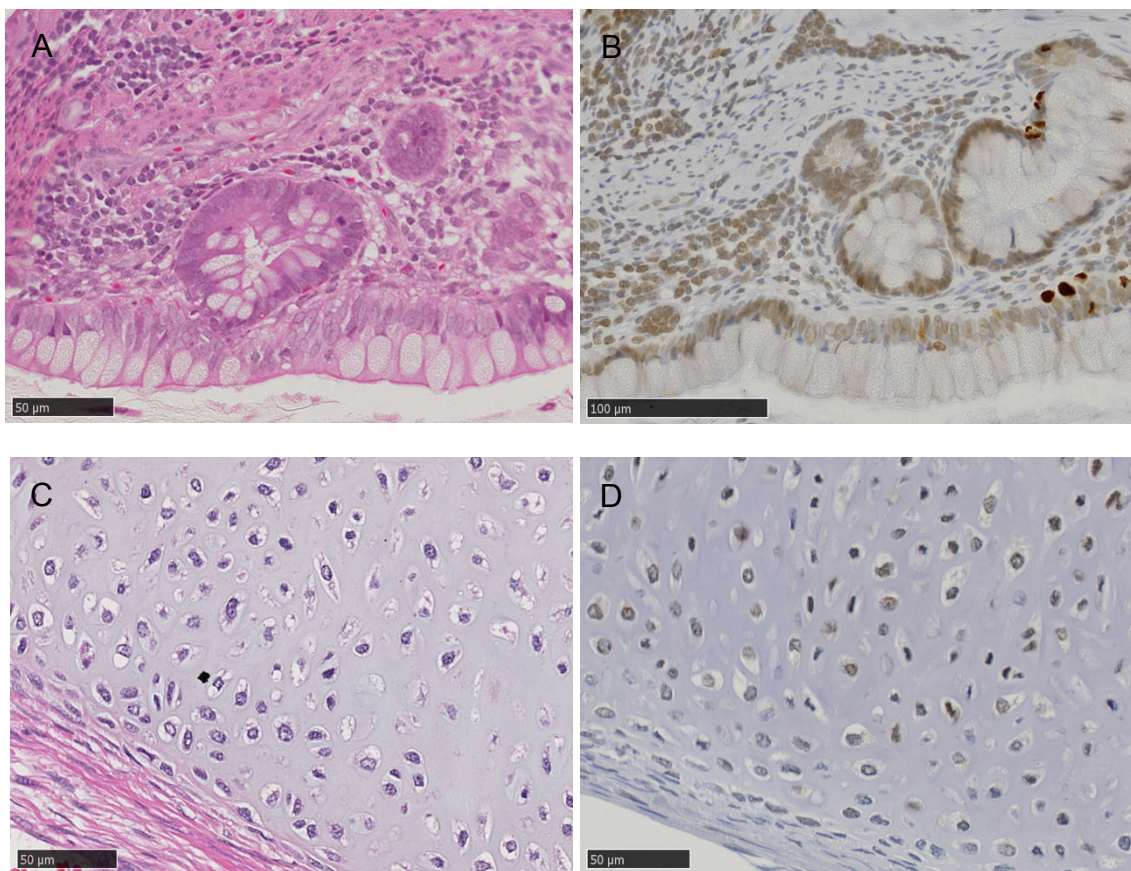


図 12 奇形腫の免疫染色例

腺管組織:(A)HE (B)DNMT3L、軟骨様組織:(C)HE (D)DNMT3L

腺管組織や、軟骨様組織で DNMT3L 陽性を示している。

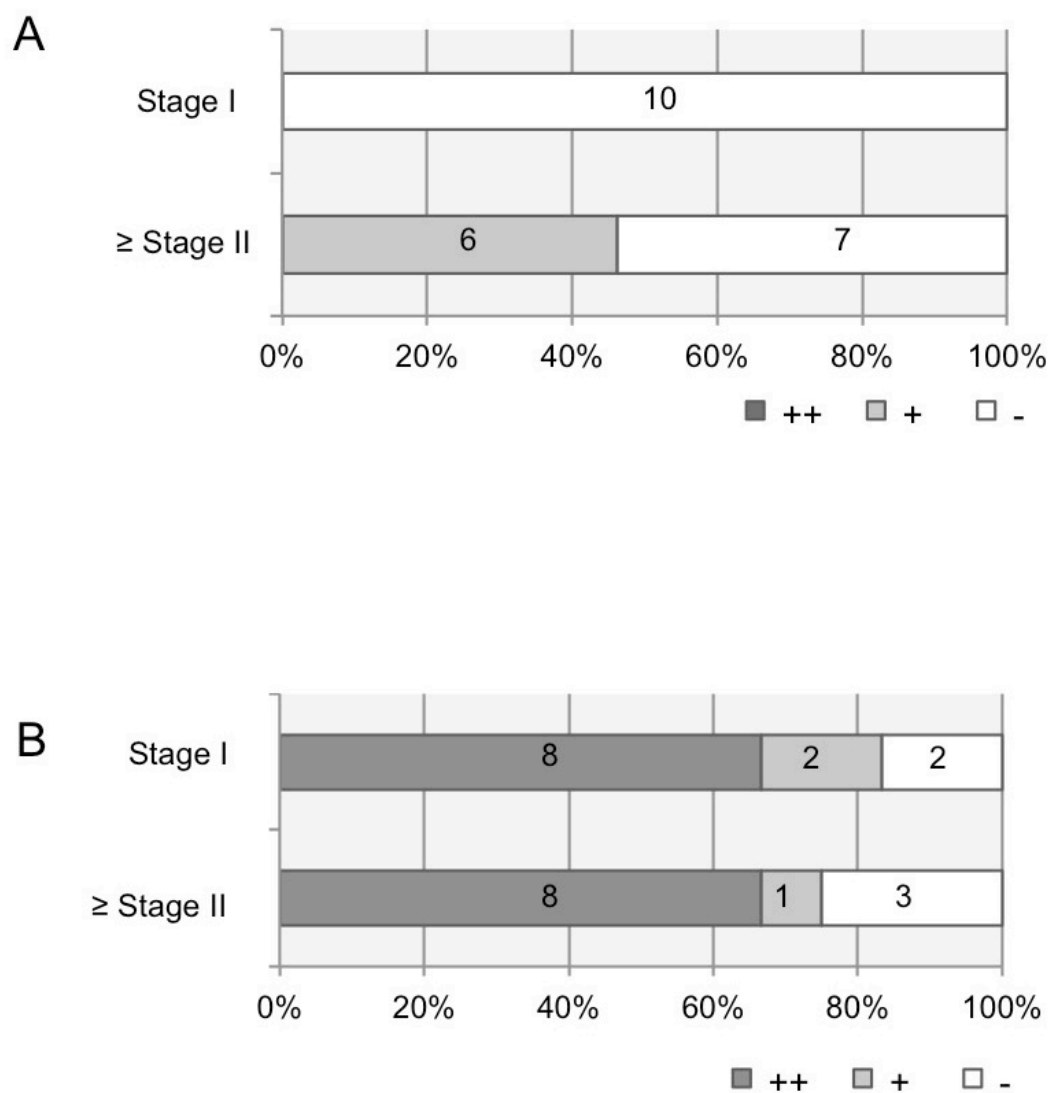


図 13 病期による DNMT3L 陽性率の比較

A 単一型セミノーマ

B 混合型精巣腫瘍

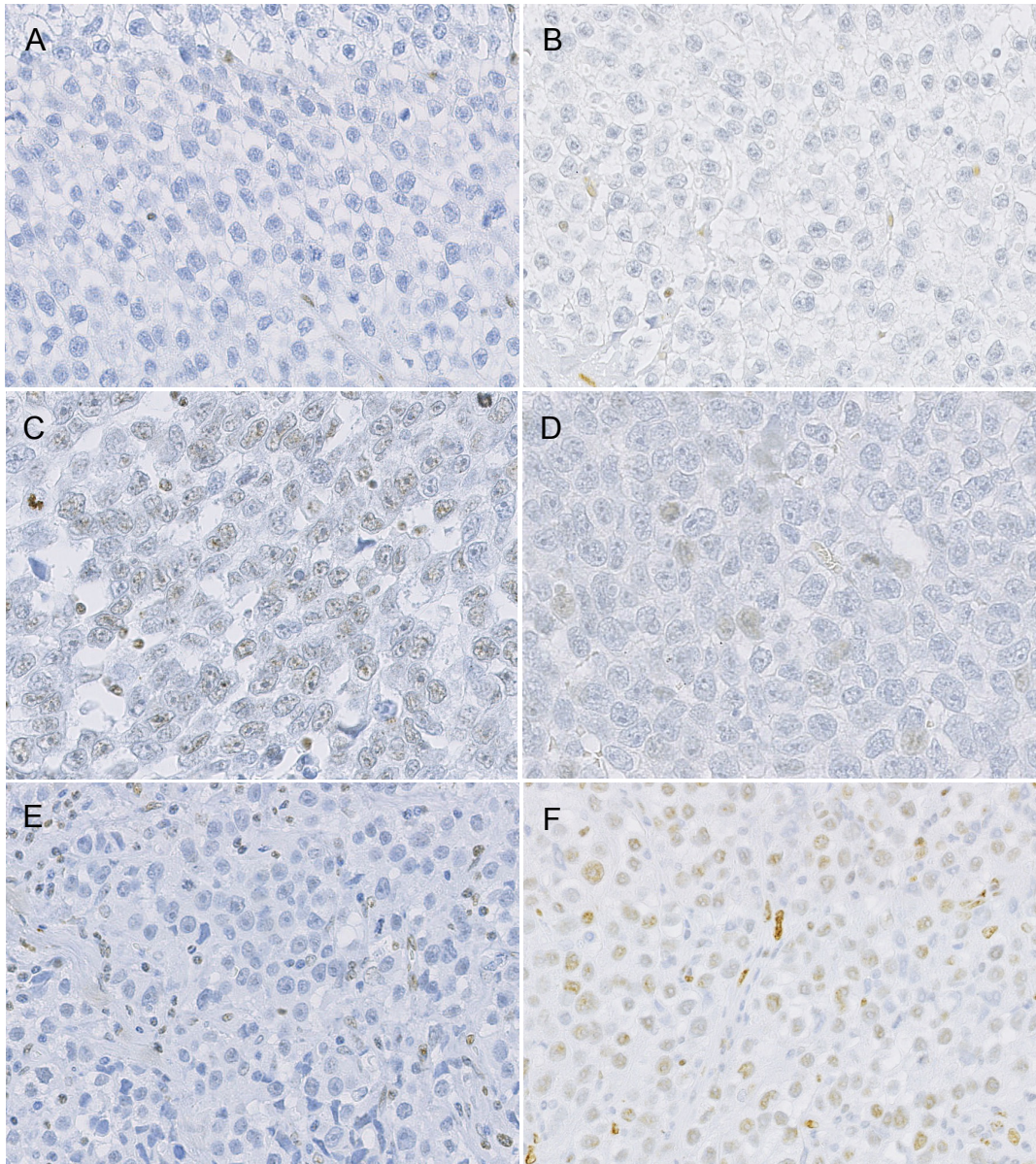


図 14 セミノーマの 5mc、5hmc の免疫染色

(A)単一型セミノーマ 5mc (B)単一型セミノーマ 5hmc (C)血清 AFP 陽性のセミノーマ 5mc (D)血清 AFP 陽性のセミノーマ 5hmc (E)非セミノーマのセミノーマ成分 5mc (F)非セミノーマのセミノーマ成分 5hmc

単一型セミノーマでは 5mc、5hmc とともに腫瘍細胞は陰性（血球成分は陽性)(A,B)。血清 AFP 陽性のセミノーマ（図 7, 8 と同一症例）は 5mc、5hmc とともに細胞の核にごく淡く染まる細胞が散在する(C,D)。非セミノーマのセミノーマ成分（図 9 と同一症例）は 5mc は陰性だが、5hmc は染色される(E,F)。

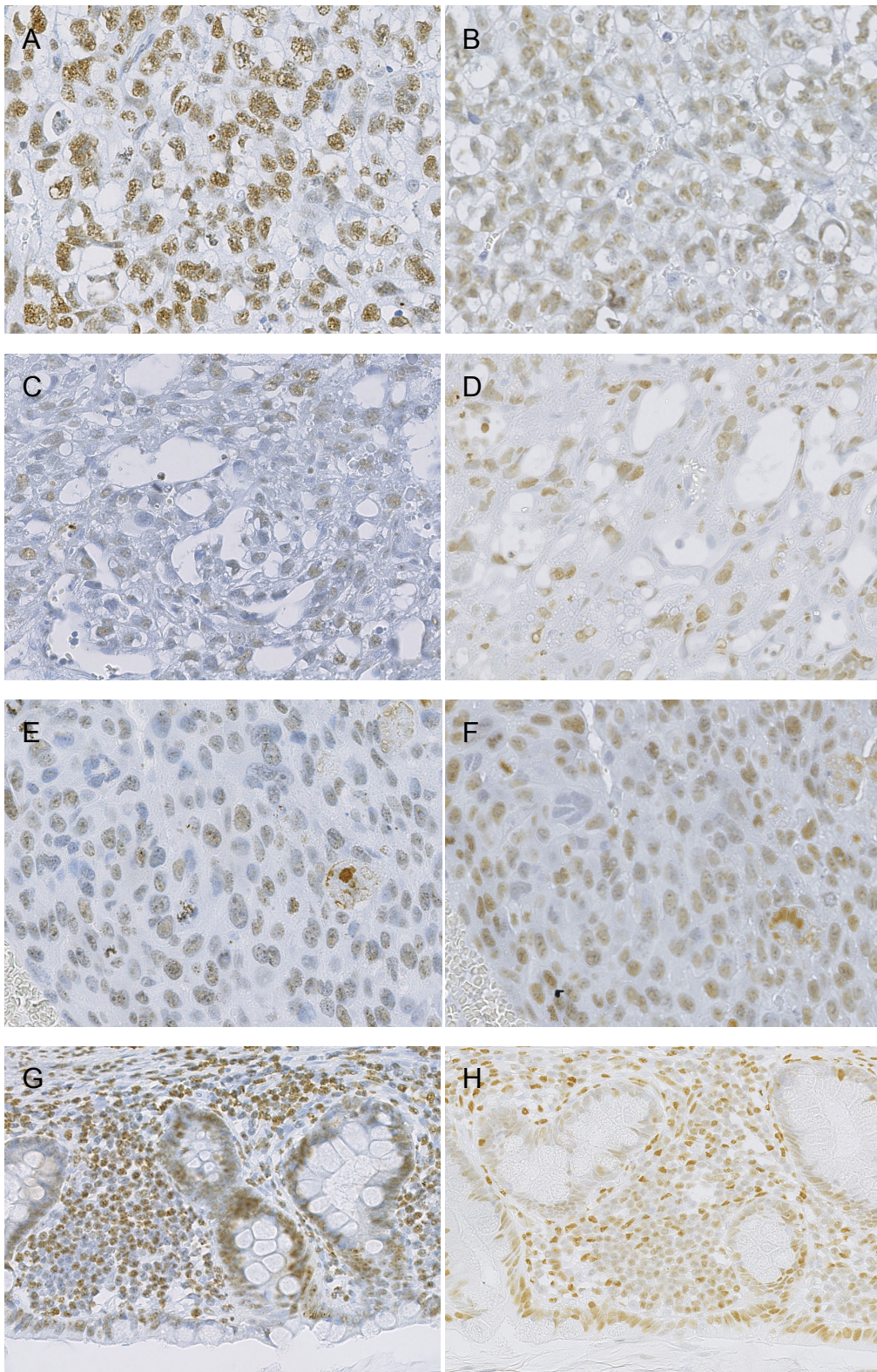


図 15 非セミノーマの 5mc、5hmc の免疫染色

(A)胎児性癌 5mc (B)胎児性癌 5hmc (C)卵黄嚢腫瘍 5mc (D)卵黄嚢腫瘍 5hmc (E)絨毛癌 5mc (F)絨毛癌 5hmc (G)奇形腫 5mc (H)奇形腫 5hmc

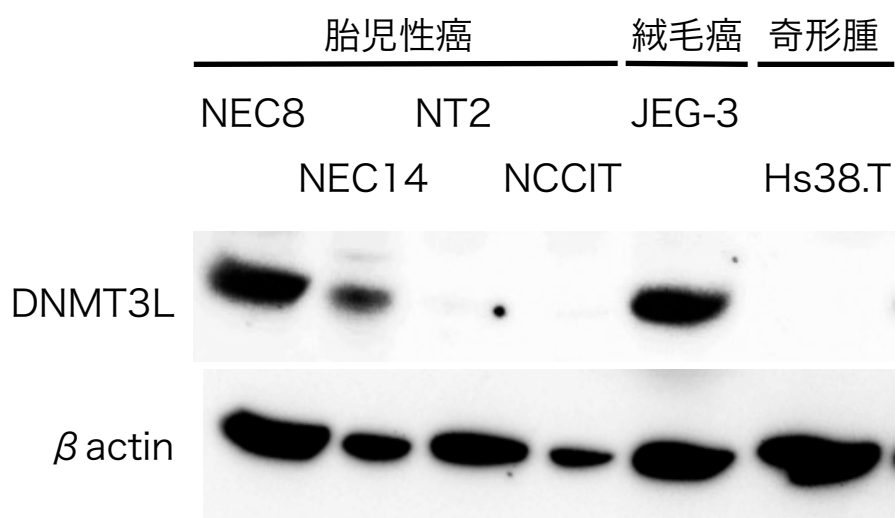


図 16 胚細胞腫瘍細胞株における DNMT3L の発現

ウェスタンブロット法での発現解析では、胎児性癌細胞株 NEC8 細胞、NEC14 細胞、絨毛癌細胞株 JEG-3 細胞で DNMT3L タンパク発現を認める。

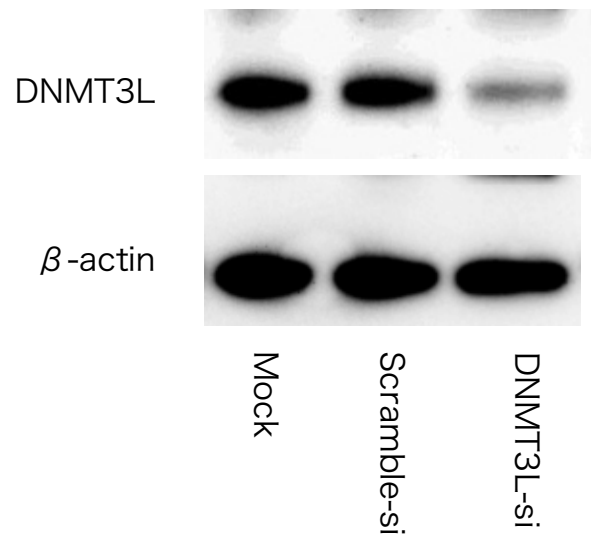


図 17 RNA 干渉法による NEC8 細胞における DNMT3L の発現抑制
73.8%の抑制効果が得られた (ImageJ ソフトウェアにて解析)。

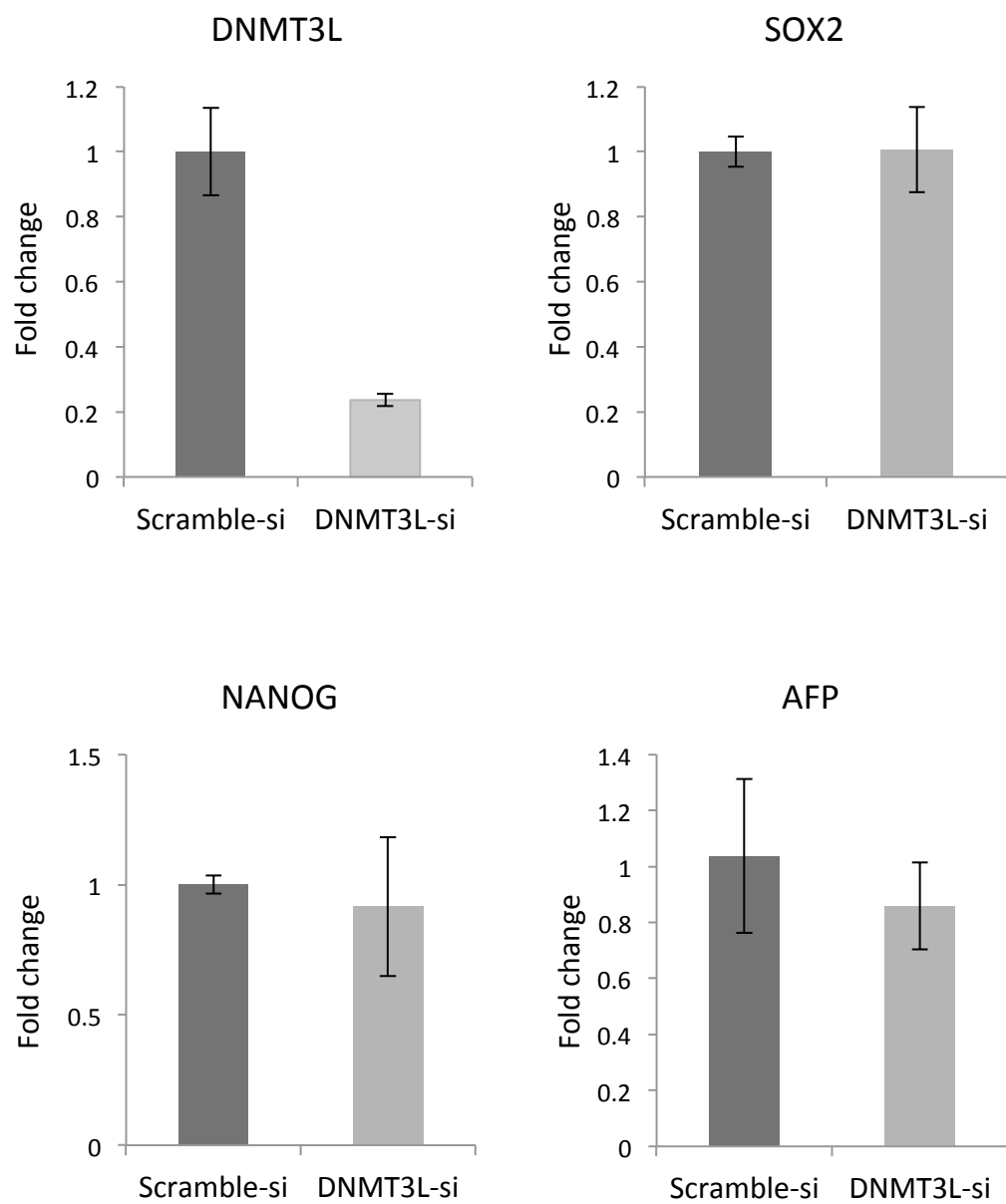


図 18 NEC8 細胞における DNMT3L 発現抑制時の分化マーカーの mRNA 発現解析

定量 PCR により組織型特有の分化マーカーとなる遺伝子の mRNA をコントロールと発現抑制細胞で比較 CT 法にて比較した。

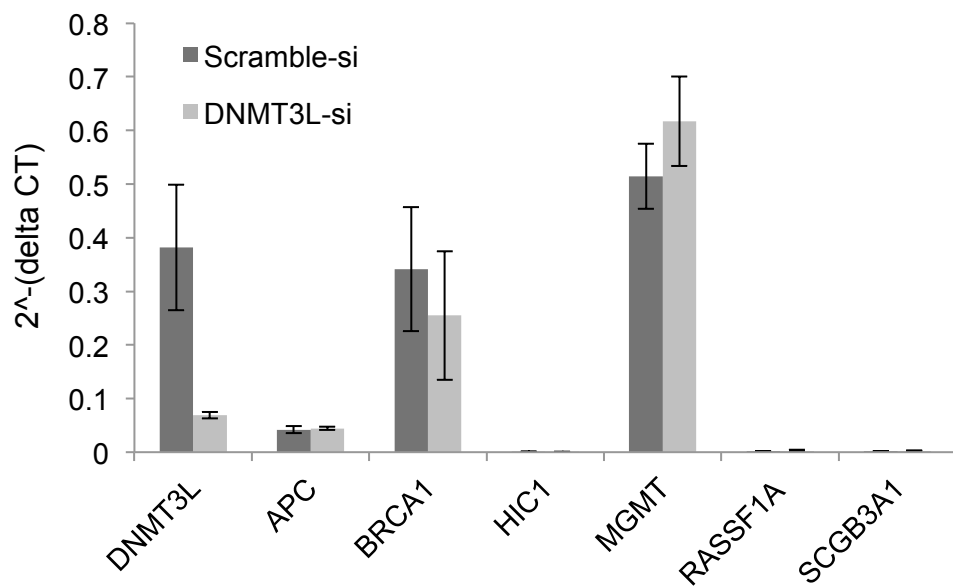


図 19 NEC8 細胞における DNMT3L 発現抑制時の癌抑制遺伝子の mRNA 発現解析

HPRT 遺伝子を内在性コントロール遺伝子として mRNA 量の補正を行い、ターゲット遺伝子の相対的発現量を定量 PCR 法により測定した。

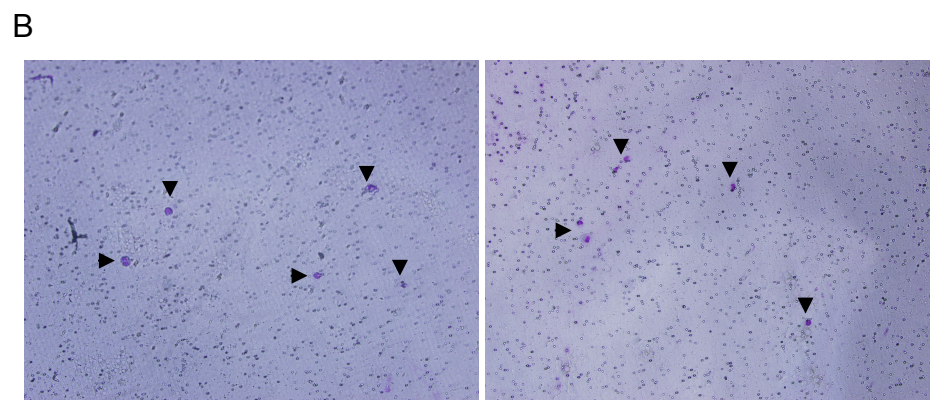
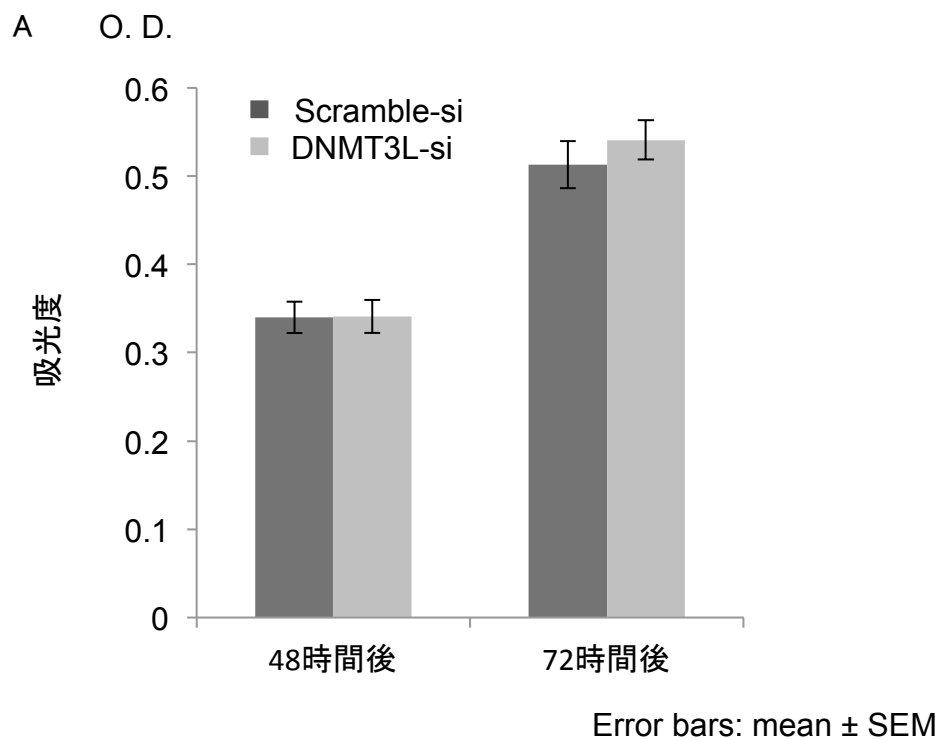


図 20 DNMT3L 発現抑制が悪性化に及ぼす影響についての検討

A. NEC8 細胞における DNMT3L 発現抑制時の細胞増殖能測定

DNMT3L 発現抑制による明らかな増殖抑制は認められなかった。

B. マトリゲル浸潤アッセイ

22 時間後に観察したメンブレンを通過した NEC8 細胞(左、DNMT3L 発現+)と NCCIT 細胞(右、DNMT3L 発現-)。どちらも浸潤する細胞は少ない。

表 1 TNM 分類 (UICC 第7版)

T分類	pTX	原発腫瘍が評価できない
	pT0	原発腫瘍を認めない。
	pTis	精細管内胚細胞腫瘍である。
	pT1	リンパ管/脈管侵襲を伴わない精巣および精巣上体に限局する腫瘍;腫瘍は精巣上体白膜に浸潤するが、鞘膜に浸潤しない。
	pT2	リンパ管/脈管侵襲を伴う精巣および精巣上体に限局する腫瘍、または精巣上体白膜をこえて進展し鞘膜に浸潤する腫瘍。
	pT3	脈管/リンパ管侵襲の有無にかかわらず、精索に浸潤する腫瘍。
	pT4	脈管/リンパ管侵襲の有無にかかわらず、陰嚢壁に浸潤する腫瘍。
N分類	NX	所属リンパ節の評価ができない。
	N0	所属リンパ節に転移を認めない。
	N1	最大径2cm以下の所属リンパ節腫瘍1つに転移を認める;または、最大径2cm以下の多発性転移を認める。
	N2	最大径が2cmを超えるが5cmは超えない所属リンパ節腫瘍1つに転移を認める;または、最大径5cm未満の多発性転移を認める。
	N3	最大径5cm以上の所属リンパ節腫瘍に転移を認める。
M分類	MX	遠隔転移の評価ができない。
	M0	遠隔転移を認めない。
	M1	遠隔転移あり。
	M1a	所属リンパ節以外のリンパ節及び肺転移。
	M1b	リンパ節及び肺以外の遠隔転移。
S分類	SX	マーカー検査が施行できない、または施行されなかった
	S0	マーカー値が正常範囲内である
	S1	LDH < 1.5 x N* かつ HCG(mIU/mL) < 5,000 かつ AFP(ng/mL) < 1,000
	S2	LDH 1.5~10 x N または HCG(mIU/mL) 5,000~50,000 または AFP(ng/mL) 1,000~10,000
	S3	LDH > 10 x N または HCG(mIU/mL) > 50,000 または AFP(ng/mL) > 10,000

表 2 TNM 病期分類 (UICC 第 7 版)

TNM病期分類 (UICC 第7版)				
	T	N	M	S
0期	pTis	N0	M0	S0
I期	pT1-4	N0	M0	SX
IA期	pT1	N0	M0	S0
IB期	pT2	N0	M0	S0
	pT3	N0	M0	S0
	pT4	N0	M0	S0
IS期	すべてのpT/TX	N0	M0	S1-3
II期	すべてのpT/TX	N1-3	M0	SX
IIA期	すべてのpT/TX	N1	M0	S0
	すべてのpT/TX	N1	M0	S1
IIB期	すべてのpT/TX	N2	M0	S0
	すべてのpT/TX	N2	M0	S1
IIC期	すべてのpT/TX	N3	M0	S0
	すべてのpT/TX	N3	M0	S1
III期	すべてのpT/TX	すべてのN	M1	SX
IIIA期	すべてのpT/TX	すべてのN	M1a	S0
	すべてのpT/TX	すべてのN	M1a	S1
IIIB期	すべてのpT/TX	N1-3	M0	S2
	すべてのpT/TX	すべてのN	M1a	S2
IIIC期	すべてのpT/TX	N1-3	M0	S3
	すべてのpT/TX	すべてのN	M1a	S3
	すべてのpT/TX	すべてのN	M1b	すべてのS

表 3 日本泌尿器科学会病期分類

I 期:転移を認めず

II 期:後腹膜以下のリンパ節にのみ転移を認める

II A:後腹膜転移巣が最大径 5cm 未満のもの

II B:後腹膜転移巣が最大径 5cm 以上のもの

III 期:遠隔転移

III 0:腫瘍マーカーが陽性であるが、転移部位を確認し得ない

III A:縦隔または鎖骨上リンパ節に転移を認めるが、その他の遠隔転移を認めない

III B:肺に遠隔転移を認める

B1:いずれかの肺野で転移巣が 4 個以下でかつ最大径が 2cm 未満のもの

B2:いずれかの肺野で転移巣が 5 個以上、または最大径が 2cm 以上のもの

III C:肺以外の臓器にも遠隔転移を認める

表 4 国際胚細胞腫瘍予後分類(IGCCC)

Good prognosis	
セミノーマ	非セミノーマ
肺以外の臓器転移が無い	肺以外の臓器転移が無い
AFP は正常範囲内	AFP<1000ng/ml
HCG, LDH は問わない	HCG<5000IU/L
	LDH<1.5x 正常上限
Intermediate prognosis	
セミノーマ	非セミノーマ
肺以外の臓器転移がある	肺以外の臓器転移が無い
	1000ng/ml \leq AFP \leq 10,000ng/ml
AFP は正常範囲内	5000IU/L \leq HCG \leq 50,000IU/mL
HCG, LDH は問わない	1.5 \times 正常上限値 \leq LDH \leq 10 \times 正常上限値
Poor prognosis	
セミノーマ	非セミノーマ
該当無し	肺以外の臓器転移がある
	または AFP>10,000ng/ml
	または hCG>50,000IU/ml
	または LDH>10 \times 正常上限値

表 5 組織型による免疫染色の染色パターン

組織型	OCT3/4	NANOG	c-KIT	SOX2	SOX17	CD30	AFP	HCG
セミノーマ	+	+	+	-	+	-	-	-/+
非セミノーマ								
胎児性癌	+	+	-	+	-	+/-	-/+	-/+
卵黄嚢腫瘍	-	-	-	-	-	-	+/	-
絨毛癌	-	-	-	-	-	-	-	+
奇形腫	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-/+

- + = homogeneous positive staining
 +/- = possible heterogeneous staining;
 +/ = predominantly positive staining
 -/+ = possible sporadic positive cells
 - = negative

Looijenga LH *et al.* (2009)より改変

表 6 解析対象の組織型と検体数

組織型		検体数
単一型	(43 患者)	
	セミノーマ	23
	胎児性癌	8
	卵黄嚢腫瘍	4
	絨毛癌	1
	奇形腫	7
混合型	(24 患者)	
	セミノーマ成分	11
	胎児性癌	18
	卵黄嚢腫瘍	4
	絨毛癌	3
	奇形腫	7
		計 86 検体

表 7 組織型別の病期の詳細

単一型

組織型	病期 I	>病期 II
	検体数	検体数
セミノーマ	10	13 (血清 AFP 陽性3例を含む)
胎児性癌	1	7
卵黄嚢腫瘍	3 (全例小児)	1
絨毛癌	0	1
奇形腫	5 (全例小児)	2

混合型

組織型	病期 I	>病期 II
	検体数	検体数
セミノーマ	5	6
胎児性癌	11	7
卵黄嚢腫瘍	2	2
絨毛癌	1	2
奇形腫	4	3

表 8 5mc、5hmc の免疫組織化学的解析

5mc	組織型	陽性数 (%)	検体数
	セミノーマ	2 (9.1%)	22
	非セミノーマ		
	セミノーマ成分	0 (0%)	10
	胎児性癌	24 (92.3%)	26
	卵黄囊腫瘍	2 (25.0%)	8
	絨毛癌	3 (75.0%)	4
	奇形腫	12 (85.7%)	14

5hmc	組織型	陽性数 (%)	検体数
	セミノーマ	2 (9.1%)	22
	非セミノーマ		
	セミノーマ成分	3 (30%)	10
	胎児性癌	24 (100%)	26
	卵黄囊腫瘍	7 (87.5%)	8
	絨毛癌	3 (75.0%)	4
	奇形腫	14 (100%)	14

表 9 検出に用いたプライマー

Primer sequence (5'to 3')	Oligo name
CTCTCAAGCTCCGTTTCACC	DNMT3L-F
GTACAGGAAGAGGGCATCCA	DNMT3L-R
GAGCTGTCTGGTTGTGAGCA	MGMT-F
GGGCTGGTGGAAATAGGCAT	MGMT-R
AAGTTCACCTGCCACTACCG	RASSF1A-F
AAGGTCAGGTGTCTCCCACT	RASSF1A-R
GCTTCTTGTGCGACGTGATC	HIC1-F
GTCATGGTCCAGGTTGAGCA	HIC1-R
GGAAATTCCCGGGGCAGTAA	APC-F
CTGGTCCATGCCTGGTTCAT	APC-R
CTCCAGCAGGAAATGGCTGA	BRCA1-F
GGCCTTCTGGATTCTGGCTT	BRCA1-R
TGCTTTCTTAGTGGGCTCGG	SCGB3A1-F
CTATGAGGTGGTTCACGGGG	SCGB3A1-R
ACACCAATCCCATCCCACT	SOX2-F
GCAAACCTTCCTGCAAAGCTC	SOX2-R
TTCTTCCTCCATGGATCTG	NANOG-F
TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	NANOG-R
AAGGATATTCCTGGGGGATG	AFP-F
CCAGACTGACCACACACACC	AFP-R
GACTTTGCTTTCCTTGGTC	HPRT-F
AGTCAAGGGCATATCCTAC	HPRT-R